GEN-PROBE

MYCOPLASMA TISSUE CULTURE NI (MTC-NI)
RAPID DETECTION SYSTEM
(bioMérieux réf. 39503 / Gen-Probe Cat. No. 104573)

MYCOPLASMA TISSUE CULTURE NI (MTC-NI)
SCHNELLNACHWEISSYSTEM
(bioMérieux Best.Nr. 39503 / Gen-Probe Kat.Nr. 104573)

DETECTION DES MYCOPLASMES DANS LES CULTURES (MTC-NI)
SYSTEME DE DETECTION RAPIDE
(bioMérieux réf. 39503 / Gen-Probe Cat. No. 104573)

CULTIVO TISULAR NI DE MICOPLASMA (MTC-NI)
SISTEMA DE DETECCION RAPIDA
(bioMérieux ref. 39503 / Gen-Probe Cat. No. 104573)

MYCOPLASMA IN COLTURE CELLULARI (MTC-NI)
SISTEMA PER L' IDENTIFICAZIONE RAPIDA
(bioMérieux cod. 39503 / Gen-Probe Cat. N. 104573)

MICOPLASMA TECIDO CULTURA NI (MTC-NI)
SISTEMA DE DETECÇÃO RÁPIDA
(bioMérieux ref. 39503 / Gen-Probe Cat. No. 104573)

GEN-PROBE

MYCOPLASMA TISSUE CULTURE NI (MTC-NI) RAPID DETECTION SYSTEM

(bioMérieux ref. 39503 / Gen-Probe Cat. No. 104573)

INTENDED USE

The GEN-PROBE MYCOPLASMA TISSUE CULTURE NI (MTC-NI) RAPID DETECTION SYSTEM is a DNA probe test for the detection of mycoplasma contamination in tissue culture.

For laboratory use.

SUMMARY AND EXPLANATION OF THE TEST

Species from the genus *Mycoplasma* are a serious source of contamination in tissue cultures. Mycoplasmas grow to high titers in cell cultures with concentrations of up to 10^8 colony forming units per milliliters of supernatant medium. Additionally, Mycoplasma may be found attached to the cell membranes (1, 4).

These organisms, which lack cell walls, do not normally produce turbidity in cell cultures and, therefore, cannot be detected visually. Mycoplasmas are resistant to antibiotics that act on the cell wall, making them difficult to eliminate from tissue cultures.

The incidence and effects of mycoplasma contamination of tissue cultures have been described by Barile, et al. (2) and McGarrity and Kotani (6). Infections have been demonstrated in up to 15% of cell lines after passage. Therefore, it has been recommended that all cell lines should be screened monthly to properly control spread of the contamination (3, 6, 9).

When present in a culture, mycoplasma interfere with investigational cell parameters. Mycoplasma can induce chromosomal abnormalities and alter the antigenicity of cell membranes. They can affect cellular metabolism by competing for nutrients and influence cell fusion procedures (8).

Six species, from the genera *Mycoplasma* and *Acholeplasma* have been shown to cause 98% of laboratory infections (5). These are:

Acholeplasma laidlawii	*Mycoplasma hyorhinis*
Mycoplasma orale	*Mycoplasma salivarium*
Mycoplasma arginini	*Mycoplasma hominis*

with *Mycoplasma hyorhinis* causing 30-40% of infections in some laboratories.

Early methods for the detection of mycoplasma relied on culture or biochemical procedures. Culturing mycoplasma can take up to three weeks and is difficult due to their requirements for microaerophilic growth conditions and specialized media. In addition, some species cannot be cultivated by routine methods.

The GEN-PROBE MTC-NI RAPID DETECTION SYSTEM employs the principle of nucleic acid hybridization and ribosomal RNA (rRNA) detection (10). It is possible to detect positive samples in 75 minutes. The GEN-PROBE MTC-NI kit utilizes an all bacterial probe that detects all species of *Mycoplasma* and *Acholeplasma* which commonly infect tissue culture as well as other bacterial species which may be present.

PRINCIPLES OF THE PROCEDURE

Nucleic acid hybridization assays are based on the ability of complementary nucleic acid strands to come together to form stable double-stranded complexes. The GEN-PROBE MTC-NI RAPID DETECTION SYSTEM uses a single-stranded DNA probe with a chemiluminescent label which is complementary to the rRNA of the target organism. After the rRNA is released from the organism, the labeled DNA probe combines with the target organism's rRNA to form a stable DNA:RNA hybrid. The Selection Reagent allows for the differentiation of non-hybridized and hybridized probe. The labeled DNA:RNA hybrids are measured in a GEN-PROBE Luminometer (7). A positive result is a luminometer reading equal to or greater than the cut-off. A value below this cut-off is a negative result.

REAGENTS

Reagents for the GEN-PROBE MTC-NI RAPID DETECTION SYSTEM are provided in two separate reagent kits:

GEN-PROBE MTC-NI KIT (bioMérieux ref. 39503 / Gen-Probe Cat. No. 104573)	**50 Tests**
Reagent 1 (Probe Reagent) (P)	5 x 10 tubes
Positive Control (PC)	1 x 2.5 mL buffered RNA solution
Reagent 2 (Hybridization Reagent) (H)	1 x 15 mL buffered solution
Reagent 3 (Selection Reagent) (S)	1 x 20 mL buffered solution

GEN-PROBE DETECTION REAGENT KIT (bioMérieux ref. 39300 / Gen-Probe Cat No. 201791)	
Detection Reagent I (RI) 0.1% hydrogen peroxide in 0.001 N nitric acid	1 x 240 mL
Detection Reagent II (RII) 1 N. sodium hydroxide	1 x 240 mL

MATERIALS REQUIRED BUT AVAILABLE SEPARATELY

Water bath or heating block (60° ± 1°C)
Micropipettes (100 µL, 300 µL)
Re-pipettor (300 µL)
Vortex Mixer
Microcentrifuge (12,000-15,000 x g)
Microcentrifuge tubes (2 mL)

AVAILABLE FROM YOUR GEN-PROBE DISTRIBUTOR

GEN-PROBE LEADER 50i Luminometer
(bioMérieux ref. 39400 / Gen-Probe Cat. No. 103100i)

GEN-PROBE Detection Reagent Kit
(bioMérieux ref. 39300 / Gen-Probe Cat. No. 201791)

GEN-PROBE Heating Block (60° ± 1°C)
(bioMérieux ref. 39406 / Gen-Probe Cat. No. 302902 or 302903)

WARNINGS AND PRECAUTIONS

A. For laboratory use only. Not for use in diagnostic procedures.

B. Use Universal Precautions when performing this assay.

C. Use for the detection of mycoplasma contamination in tissue cultures.

D. Use only supplied or specified disposable laboratory ware.

E. Avoid contact of Detection Reagents I and II with skin, eyes and mucous membranes. Wash with water if these reagents come into contact with skin. If spills of these reagents occur, dilute with water before wiping dry.

STORAGE AND HANDLING REQUIREMENTS

Probe Reagent Tubes must be stored in the foil pouches at 2° to 8°C. The Probe Reagent Tubes are stable in the unopened pouches until the expiration date indicated. Once opened, the pouch should be resealed, stored at 2° to 8°C, and the tubes should be used within one month and prior to the expiration date.

The positive control should be stored at 2° to 8°C and warmed with gentle mixing at 60°C for 2 minutes prior to use.

Other reagents used in the MTC-NI Kit may be stored between 2° to 25°C and are stable until the expiration date indicated.

MTC-NI reagent labels include the following standardized symbols for storage and handling instructions:

Expiration Date Lot Number

Temperature Limitation

Symbols are based on European Standard recommendations.

DO NOT FREEZE THE REAGENTS.

SAMPLE COLLECTION

The GEN-PROBE MTC-NI RAPID DETECTION SYSTEM is designed to detect mycoplasma contamination in tissue culture. Tissue culture cell suspensions may also be assayed using this method. This test may be performed on cultures grown in antibiotic-containing media, but Mycoplasma levels will be reduced due to the presence of the antibiotics. It is recommended that cells be passed twice in the absence of antibiotics before being assayed. Media to be tested should be exposed to cells a minimum of three days. Refer to the PROCEDURAL NOTES for processing specimens that do not meet these criteria. For maximum sensitivity samples should be prepared within 4 hours of collection. If this is not possible the media may be stored at 2° to 8°C for no longer than 3 days before sample preparation. Samples may be archived or stored for later assay by processing them through step 3 of SAMPLE PREPARATION. The hybridization buffer should be added to the pellet and the sample stored at -20°C or below for one month.

NOTE: Samples which are visibly turbid may be contaminated with yeast or other bacteria and should be discarded.

TEST PROCEDURE

A. EQUIPMENT PREPARATION

1. Adjust the heating block or water bath to 60° ± 1°C.
2. Prepare the GEN-PROBE Luminometer for operation. Make sure there is sufficient volume of Detection Reagents I and II to complete the tests.

B. SAMPLE PREPARATION

1. Pipette 1.5 mL of tissue culture medium into a microcentrifuge tube. Identify and mark the side of the tube on which the pellet will form. For samples containing greater than 1 million eukaryotic cells please refer to PROCEDURAL NOTES.
2. Centrifuge at 12,000-15,000 x g for 10 minutes. Remove all of the supernatant with a Pasteur pipette and discard. The pellet may not be visible and care must be taken to avoid any loss of the pellet when removing the supernatant.

3. Add 100 µL of Hybridization Reagent to the microcentrifuge tube. Vortex to mix thoroughly. (These samples may be stored at -20°C or below for 1 month. Frozen samples should be heated at 60° ± 1°C for 2 minutes and vortexed to achieve homogeneity prior to use in the assay.)

C. HYBRIDIZATION

1. Open the foil pouch by cutting evenly across the top of the pouch. Remove enough Probe Reagent Tubes to test the samples and/or controls. Re-seal the pouch by folding the opened edge over several times and securing with adhesive tape or a clip. Leave the desiccant pillow in the pouch and store the resealed pouch at 2° to 8°C.
2. Label a sufficient number of Probe Reagent Tubes for samples and controls. Remove and retain the caps.
3. Pipette 100 µL Hybridization Reagent into the bottom of the Negative Control Tubes.
4. Pipette 100 µL of Positive Control into the bottom of the Positive Control Tubes.
5. Pipette 100 µL of each sample into the bottom of the appropriately labeled sample tube.
6. Recap all tubes and vortex at moderate speed for 1 to 3 seconds to mix. All liquid should be in the bottom of the tubes during the incubation.
7. Incubate for 45 minutes at 60° ± 1°C in a water bath or heat block.

D. SELECTION

1. Remove the Probe Reagent Tubes from the water bath or heating block. Remove and retain the caps. Immediately pipette 300 µL of Reagent 3 (Selection Reagent) into each tube. Re-cap the tubes and vortex at moderate speed for 1 to 3 seconds to mix. All liquid should be in the bottom of the tubes during the incubation.
2. Incubate the Probe Reagent Tubes for 10 minutes at 60° ± 1°C in a water bath or heating block.
3. Remove the Probe Reagent Tubes from the water bath or heating block and leave them at room temperature for at least 5 minutes. Remove and discard the caps. Read the results in the GEN-PROBE Luminometer within 30 minutes after removing from the water bath or heating block.

E. DETECTION

1. Select the appropriate protocol from the menu of the GEN-PROBE Luminometer software.
2. Using a damp tissue or paper towel, wipe each tube to ensure that no residue is present on the outside of the tube and insert the tube into the GEN-PROBE Luminometer according to the instrument directions.
3. When the analysis is complete, remove the tube(s) from the luminometer.

PROCEDURAL NOTES

A. REAGENT: Reagent 2 (Hybridization Reagent) and the Positive Control may precipitate. Warming and mixing the solution at 60° ± 1°C for 2 minutes will dissolve this precipitate.

B. TEMPERATURE: The Hybridization and Selection reactions are temperature dependent. Therefore, it is imperative that the water bath or heating block is maintained within the specified temperature range during the entire assay.

C. TIME: The Hybridization and Selection reactions are time dependent. Hybridize at least 45 minutes but no more than 60 minutes. Incubate the Probe Reagent Tubes during the SELECTION step for at least 10 minutes but no more than 12 minutes.

D. WATER BATH: The level of water in the water bath should be maintained to ensure that the liquid reaction mixture in the Probe Reagent Tube is completely submerged during the reaction.

E. VORTEXING: It is crucial to have a homogeneous mixture during the SELECTION step, specifically after the addition of Reagent 3. All liquid must be in the bottom of the tube during the incubations.

F. MEDIA SAMPLES CONTAINING CELLS: If a large number of eukaryotic cells are present in the sample (i. e., cell suspensions), centrifuge at 500 x g for 5 minutes. Remove the supernatant from this low speed spin and use 1.5 mL of it as the sample. Proceed from step 1 in SAMPLE PREPARATION.

G. PELLETING: When preparing samples, remove as much supernatant as possible from the centrifuged samples with a Pasteur pipette. Remnants of media have proven to cause low false positives. However, be careful not to disturb the Mycoplasma pellet, which may not be visible.

H. SAMPLES IN REPEAT RANGE:

1. Growth of cultures in antibiotics may reduce Mycoplasma levels. It is recommended that cells be passed twice in the antibiotic-free media before performing the assay. Media to be tested must be in contact with the tissue culture cells for a minimum of three days.
2. Preparing a larger sample proportionately increases the sensitivity of the test. Prepare a pellet from a larger sample volume as follows:
   a. Obtain a centrifuge tube which will contain from 10 to 50 mL and which can be centrifuged at high speed. Carefully mark the position where the pellet will form.
   b. Add the collected media and centrifuge at 12,000 to 15,000 x g for 15 minutes. Carefully remove and discard the supernatant. The pellet may not be visible and care must be taken to avoid any loss of the pellet during this step.
   c. Resuspend the pellet in 1.5 mL of sterile saline or cell culture media and proceed to step 1 of the SAMPLE PREPARATION procedure.

RESULTS

A. INTERPRETATION OF RESULTS

The results of the GEN-PROBE MTC-NI RAPID DETECTION SYSTEM are based on Relative Light Unit (RLU) cut-off values. Samples producing greater than or equal to the positive cut-off value are considered positive. Signals less than the negative cut-off value are considered negative. Results in repeat range should be repeated. Samples continuing to give values within the repeat range may represent very low level contamination and you may wish to re-test as described in PROCEDURAL NOTES.

	Positive	Negative
Cut-off Values:	> 5,000 RLU	< 3,000 RLU
Repeat Range:	3,000 to 5,000 RLU	

B. QUALITY CONTROL AND ACCEPTABILITY OF RESULTS

Negative Control and Positive Control should be within the following ranges:

Negative Control: < 3,000 RLU
Positive Control: 35,000-85,000 RLU

To check machine calibration and functioning please refer to the instrument manual.

LIMITATIONS

Use only for the detection of bacterial contamination in tissue culture samples. Bacteria other than mycoplasma will vary in positivity based on their lysis during the sample preparation.

This test does not distinguish among bacterial species.

A negative result does not exclude the possibility that mycoplasma contamination is present at a level below the sensitivity of the test, which is approximately 100,000 mycoplasma per mL of culture media.

This test will detect certain other bacterial species if they are lysed by the sample preparation procedures; see PERFORMANCE CHARACTERISTICS. In any case, a positive result indicates contamination of the tissue culture sample.

PERFORMANCE CHARACTERISTICS

Hybridization of the probe with a wide range of commonly occurring species of *Acholeplasma, Mycoplasma, Spiroplasma*, and *Ureaplasma* have yielded positive signals at > 10^5 organisms.

The following species of Mycoplasma are among those tested with the GEN-PROBE MTC-NI RAPID DETECTION SYSTEM.

Acholeplasma laidlawii	*Mycoplasma negroni*
Mycoplasma arginini	*Mycoplasma neurolyticum*
Mycoplasma arthritidis	*Mycoplasma orale*
Mycoplasma collis	*Mycoplasma pirum*
Mycoplasma fermentans	*Mycoplasma primatum*
Mycoplasma gallisepticum	*Mycoplasma pneumoniae*
Mycoplasma genitalium	*Mycoplasma pulmonis*
Mycoplasma hominis	*Mycoplasma sualvi*
Mycoplasma hyorhinis	*Spiroplasma species*
Mycoplasma iowae	*Ureaplasma parvum*
Mycoplasma muris	*Ureaplasma urealyticum*

Gram negative organisms from a wide variety of taxa also yield positive signals with the broad spectrum bacterial probe contained in this kit when prepared as outlined in the SAMPLE PREPARATION section. Reaction to Gram positive organisms is dependent on the ability of the sample preparation method to lyse the organisms. With appropriate lysis conditions all Gram positive organisms from a wide range of taxa also react with this probe system. No reaction to eukaryotic targets has been observed.

EXPECTED VALUES

A. SAMPLES:

One hundred and fifty samples were tested using GEN-PROBE MTC-NI kit and the GEN-PROBE MTC isotopic assay.

RLU values for positive samples ranged from 7,644 to 3,034,700 RLU.

RLU values for the negative samples ranged from 490 to 2,963 RLU.

There were no discrepant samples, all samples positive by the isotopic assay were also positive by this non-isotopic assay, all negative samples were determined to be negative in both assays.

B. CONTROLS:

One hundred and fifty controls were tested and gave the following results:

	Number of Observations	RLU Values
Negative Controls	81	273 to 2,484 mean = 903 ± 371 SD
Positive Controls	69	35,489 to 72,955 mean = 52,092 ± 8,283 SD

These data were generated by several technicians on different days with multiple lots of reagents using various GEN-PROBE LEADERS.

TROUBLESHOOTING

LOW POSITIVE CONTROL (BELOW 35,000 RLU)

A. Confirm that the positive control tube contains approximately 800 µL. Low readings may indicate that less than 100 µL of Positive Control was added to the Positive Control probe tube.

B. Check that the temperature of the water bath or heat block is 60° ± 1°C.

C. Ensure that the probe tube is immersed in water bath or heat block so as to completely cover the liquid contents during the reaction. Do not allow any water or other non-sterile solutions to enter the probe tubes during the assay.

D. Check luminometer settings to confirm a reading time of 2 seconds.

E. Check accuracy of pipetting instruments.

HIGH POSITIVE CONTROL (ABOVE 85,000 RLU)

A. Confirm that the positive control tube contains approximately 800 µL. High readings may indicate that 300 µL of the selection reagent was not added.

B. Check that the temperature of the water bath or heat block is 60° ± 1°C and that the luminometer settings are correct.

C. Ensure that the tubes are incubated for 10 minutes during the Selection step.

HIGH NEGATIVE CONTROL (ABOVE 3000 RLU)

A. Confirm that the negative control tube contains approximately 800 µL. High readings may indicate that 300 µL of the Selection Reagent was not added.

B. Check that the temperature of water bath or heat block is 60° ± 1°C and that the luminometer settings are correct.

C. Ensure that the tubes are incubated for 10 minutes during the SELECTION Step.

D. DO NOT interchange the caps of positive and negative controls.

E. Eliminate static charge by wiping tubes with a damp cloth or tissue just prior to placing in the luminometer.

SAMPLES IN THE REPEAT RANGE (3000-5000 RLU)

A. Check that the temperature of the incubations is 60° ± 1°C. An accurate thermometer must be used.

B. Check that the sample is homogeneous and that no drops remain above the surface of the liquid during either incubation.

C. Cultures may be contaminated with a very low level of bacteria. Increase the sensitivity of the test as described in PROCEDURAL NOTES - H. Cells may need to be passed at least twice after removal from cryogenic storage before there are sufficient bacteria for detection.

D. Culture media cannot be frozen before centrifugation, step 2 of SAMPLE PREPARATION.

VARIABLE READINGS

A. Check accuracy of pipetting instruments.

B. Eliminate static charge and any residue by wiping tubes with a damp cloth or tissue just prior to placing in the luminometer.

C. Ensure that the entire sample pellet is homogeneously resuspended and that all of it is transferred to the probe tube.

D. Check function of luminometer pumps as directed by the instrument manual. Check instrument calibration.

E. Contamination of tubes or reagents with RNase or bacteria may affect test results. Use aseptic technique when handling all tubes and reagents.

MYCOPLASMA TISSUE CULTURE NI (MTC-NI) SCHNELLNACHWEISSYSTEM

(bioMérieux Best.Nr. 39503 / Gen-Probe Kat.Nr. 104573)

VERWENDUNGSZWECK

Das GEN-PROBE MYCOPLASMA TISSUE CULTURE NI (MTC-NI) SCHNELLNACHWEISSYSTEM ist ein DNA-Sonden-Test zum Nachweis von Mycoplasma-Kontaminationen in Zellkulturen.

Für den Labor-Gebrauch.

ZUSAMMENFASSUNG UND TESTERKLÄRUNG

Spezies der Gattung *Mycoplasma* sind eine ernstzunehmende Ursache für Kontaminationen in Zellkulturen. Mycoplasmen wachsen in Zellkulturen in hohen Konzentrationen mit bis zu 10^8 Kolonie-bildenden Einheiten pro Milliliter Überstand. Außerdem können sich Mycoplasmen an die Zellmembranen binden (1, 4).

Diese Organismen, denen die Zellwände fehlen, rufen normalerweise keine Trübung in Zellkulturen hervor und können deshalb visuell nicht nachgewiesen werden. Mycoplasmen sind gegenüber Antibiotika, die auf die Zellwand einwirken, resistent, so daß es schwierig ist, sie aus Zellkulturen zu eliminieren.

Die Inzidenz und die Auswirkungen von Mycoplasma-Kontaminationen in Zellkulturen wurde von Barile et al. (2) und McGarrity und Kotani (6) beschrieben. In bis zu 15% der Zellinien wurden nach der Passage Infektionen nachgewiesen. Es wurde deshalb empfohlen, daß alle Zellinien monatlich gescreent werden sollten, um eine Ausbreitung der Kontamination zu kontrollieren (3, 6, 9).

Wenn in einer Kultur Mycoplasmen vorhanden sind, kommt es zu Interferenzen bei der Untersuchung von Zellparametern. Mycoplasmen können Veränderungen an den Chromosomen und den Antigenen der Zellmembranen hervorrufen. Sie können den Zellstoffwechsel beeinflussen, da sie mit den Zellen um die Nährstoffe konkurrieren und Zellfusionsvorgänge beeinflussen (8).

Es wurde gezeigt, daß folgende 6 Spezies aus der Gattung *Mycoplasma* und *Acholeplasma* für 98% der Laborkontaminationen verantwortlich sind (5):

Acholeplasma laidlawii	*Mycoplasma hyorhinis*
Mycoplasma orale	*Mycoplasma salivarium*
Mycoplasma arginini	*Mycoplasma hominis*

In einigen Laboratorien ist *Mycoplasma hyorhinis* für 30-40% der Infektionen verantwortlich.

Erste Methoden zum Nachweis von Mycoplasmen basierten auf der Kultur und biochemischen Verfahren. Die Anzucht von Mycoplasmen kann bis zu 3 Wochen dauern und ist aufgrund der Wachstumsansprüche dieser Organismen (mikroaerophile Atmosphäre und Spezialmedien) schwierig. Außerdem können einige Spezies mit Routinemethoden nicht angezüchtet werden.

Das GEN-PROBE MTC-NI SCHNELLNACHWEISSYSTEM arbeitet nach dem Prinzip der Nukleinsäurehybridisierung und dem Nachweis ribosomaler RNA (rRNA) (10). Positive Proben können innerhalb von 75 Minuten nachgewiesen werden. Der GEN-PROBE MTC-NI Kit enthält eine Sonde für alle Bakterien, mit der alle *Mycoplasma* und *Acholeplasma* Spezies, die häufig Zellkulturen infizieren sowie andere Bakterienspezies, die vorhanden sein können, nachge-wiesen werden.

PRINZIP

Nukleinsäure-Hybridisierungstests basieren auf der Fähigkeit komplementärer Nukleinsäuresequenzen spezifisch zu hybridisieren und stabile Doppelstrang-Komplexe zu bilden. Der GEN-PROBE MTC-NI SCHNELLNACHWEISSYSTEM enthält eine einzelsträngige DNA-Sonde, an die ein Chemilumineszenzmarker gekoppelt ist. Diese Sonde ist der rRNA der Zielsequenz komplementär. Nachdem die rRNA des Zielorganismus freigesetzt ist, verbindet sich die Sonde mit dieser und bildet einen stabilen DNA-RNA Komplex. Ein Selektionsreagenz baut den Chemilumineszenzmarker der ungebundenen Sonde ab, während der Marker der gebundenen Sonde intakt bleibt. Das GEN-PROBE Luminometer mißt das von den DNA-RNA-Hybriden abgegebene Lichtsignal (7). Ein positives Ergebnis liegt vor, wenn der vom luminometer angezeigte Wert gleich oder größer ist als der Grenzwert (cut-off). Liegt der Wert unterhalb des Grenzwertes, ist das Ergebnis negativ.

REAGENZIEN

Die Reagenzien des GEN-PROBE MTC-NI SCHNELLNACHWEISSYSTEM werden in zwei separaten Reagenzienkits geliefert:

GEN-PROBE MTC-NI KIT (bioMérieux Best.Nr. 39503 / Gen-Probe Kat. Nr. 104573)	**50 Tests**
Reagenz 1 (Sondenreagenz) (P)	5 x 10 Röhrchen
Positivkontrolle (PC)	1 x 2,5 ml RNA Pufferlösung
Reagenz 2 (Hybridisierungsreagenz) (H)	1 x 15 ml Pufferlösung
Reagenz 3 (Selektionsreagenz) (S)	1 x 20 ml Pufferlösung

GEN-PROBE DETEKTIONSREAGENZIEN-KIT (bioMérieux Best.Nr. 39300 / Gen-Probe Kat.Nr. 201791)	
Detektionsreagenz I (RI) 0,1% Wasserstoffperoxid in 0,001 N. Salpetersäure	1 x 240 ml
Detektionsreagenz II (RII) 1 N Natriumhydroxyd	1 x 240 ml

ERFORDERLICHE, JEDOCH NICHT IM LIEFERUMFANG ENTHALTENE MATERIALIEN

Wasserbad oder Heizblock (60° ± 1°C)
Mikropipetten (100 µl, 300 µl)
Repetierpipette (300 µl)
Vortex
Mikrozentrifuge (12.000-15.000 x g)
Mikrozentrifugenröhrchen (2 ml)

ZUSÄTZLICHE VERFÜGBARE MATERIALIEN

GEN-PROBE LEADER 50i Luminometer
(bioMérieux Best.Nr. 39400 / Gen-Probe Kat. Nr. 103100i)

GEN-PROBE DETEKTIONSREAGENZIEN-KIT
(bioMérieux Best.Nr. 39300 / Gen-Probe Kat. Nr. 201791)

GEN-PROBE Heizblock (60° ± 1°C)
(bioMérieux Best.Nr. 39406 / Gen-Probe Kat. Nr. 302902 oder 302903)

VORSICHTSMASSNAHMEN

A. Nur für den Laborgebrauch. Nicht für die Diagnostik verwenden.

B. Beachten Sie bei der Testdurchführung die üblichen Vorsichtsmaßnahmen.

C. Dieser Test ist für den Nachweis von Mycoplasma-Kontaminationen in Zellkulturen bestimmt.

D. Verwenden Sie nur die mitgelieferten oder empfohlenen Einweg-Labormaterialien.

E. Vermeiden Sie jeden Kontakt der Detektionsreagenzien I und II mit der Haut, den Augen oder den Schleimhäuten. Bei eventuellem Kontakt sofort mit Wasser spülen. Beim Verschütten einer dieser Reagenzien, die Flüssigkeit vor dem Aufwischen mit Wasser verdünnen.

LAGERUNG

Die Sondenreagenzröhrchen müssen bei 2° - 8°C in den Aluminiumbeuteln gelagert werden. Die original verpackten Sondenreagenzröhrchen sind bis zum angegebenen Verfallsdatum haltbar. Geöffnete Beutel stets wieder sorgfältig verschließen, bei 2° - 8°C lagern und die Röhrchen innerhalb eines Monats und vor dem Verfallsdatum aufbrauchen.

Die Positivkontrolle sollte bei 2° bis 8°C gelagert werden und vor Gebrauch 2 min unter vorsichtigem Mischen bei 60°C erhitzt werden.

Die übrigen Reagenzien des MTC-NI Kits sind bei 2° - 25°C bis zum angegebenen Verfallsdatum haltbar.

Auf den Etiketten der MTC-NI Reagenzien sind folgende Standardsymbole für die Lagerung und Handhabung der Reagenzien angegeben:

Verfallsdatum. Chargennummer a

Temperatureinschränkung

Die Symbole basieren auf dem europäischen Standard Empfehlungen.

DIE REAGENZIEN NICHT EINFRIEREN.

PROBENGEWINNUNG

Das GEN-PROBE MTC-NI SCHNELLNACHWEISSYSTEM dient zum Nachweis von Mycoplasma-Kontaminationen in Zellkulturen. Suspensionen aus Zellkulturen können ebenfalls mit dieser Methode getestet werden. Dieser Test kann mit Kulturen durchgeführt werden, die in Antibiotika-haltigen Medien gewachsen sind, die Mycoplasmenspiegel werden jedoch aufgrund der vorhandenen Antibiotika verringert sein. Es ist empfehlenswert, die Zellen vor der Testung zweimal in Abwesenheit von Antibiotika zu subkultivieren. Die zu testenden Medien sollten mindestens 3 Tage Kontakt mit den Zellen haben. Bei der Testung von Proben, die diesen Kriterien nicht entsprechen, beachten Sie die HINWEISE ZUR TESTDURCHFÜHRUNG. Um eine maximale Sensitivität zu erreichen, sollten die Proben innerhalb 4 Stunden nach der Probengewinnung vorbereitet werden. Wenn dies nicht möglich ist, können die Medien bei 2° - 8°C maximal 3 Tage bis zur Probenvorbereitung gelagert werden. Die Proben können archiviert oder für eine spätere Testung aufbewahrt werden, bearbeiten Sie die Proben in diesem Fall wie im Abschnitt PROBENVORBEREITUNG bis einschließlich Arbeitsschritt 3 beschrieben. Der Hybridisierungspuffer sollte dem Sediment zugegeben werden und die Probe bei -20°C oder darunter für einen Monat gelagert werden.

HINWEIS: Proben mit sichtbarer Trübung können mit Hefen oder anderen Bakterien kontaminiert sein und sollten verworfen werden.

TESTDURCHFÜHRUNG

A. VORBEREITUNG DER GERÄTE UND MATERIALIEN

1. Den Heizblock oder das Wasserbad auf 60° ± 1°C einstellen.
2. Bereiten Sie das GEN-PROBE Luminometer für die Messung vor. Vergewissern Sie sich, daß für die Durchführung der Tests ausreichend Detektionsreagenz I und II vorhanden ist.

B. PROBENVORBEREITUNG

1. Pipettieren Sie 1,5 ml Zellkulturmedium in ein Mikrozentrifugenröhrchen. Bestimmen und markieren Sie die Seite des Röhrchens, auf der sich das Sediment bilden wird. Bei Proben, die mehr als 1 Million eukaryontische Zellen enthalten, beachten Sie bitte die HINWEISE ZUR TESTDURCHFÜHRUNG.
2. Zentrifugieren Sie für 10 min bei 12.000-15.000 x g. Entfernen Sie mit einer Pasteurpipette den gesamten Überstand und verwerfen Sie diesen. Es kann sein, daß das Sediment nicht sichtbar ist. Arbeiten Sie deshalb bei der Entfernung des Überstandes vorsichtig, um jeglichen Verlust des Sediments zu vermeiden.
3. Geben Sie 100 µl Hybridisierungsreagenz in das Mikrozentrifugenröhrchen. Vortexen Sie dieses, um den Inhalt gründlich durchzumischen. (Diese Proben können einen Monat bei -20°C oder darunter gelagert werden. Tiefgefrorene Proben sollten vor der Testung für 2 min bei 60° ± 1°C erhitzt und gevortext werden, um eine homogene Lösung zu erhalten.)

C. HYBRIDISIERUNG

1. Den Folienbeutel am oberen Ende aufschneiden. Entnehmen Sie die für die Proben und/oder Kontrollen erforderliche Anzahl an Sonden-reagenzröhrchen. Den Beutel an der geöffneten Seite mehrfach umschlagen und mit Klebeband oder einer Klammer wieder dicht verschließen. Den Trockenbeutel nicht herausnehmen und den verschlossenen Beutel wieder bei 2° - 8°C lagern.
2. Beschriften Sie für die Proben und Kontrollen eine ausreichende Anzahl Sondenreagenzröhrchen. Entfernen Sie die Stopfen und bewahren Sie diese auf.
3. Pipettieren Sie 100 µl Hybridisierungsreagenz auf den Boden der negativen Kontrollröhrchen.
4. Pipettieren Sie 100 µl der Positivkontrolle auf den Boden der positiven Kontrollröhrchen.
5. Pipettieren Sie 100 µl jeder Probe auf den Boden der entsprechend beschrifteten Probenröhrchen.
6. Verschließen Sie alle Röhrchen und vortexen Sie sie bei mittlerer Geschwindigkeit für 1 bis 3 sec, um den Inhalt durchzumischen. Die gesamte Flüssigkeit sollte sich während der Inkubation auf dem Boden der Röhrchen befinden.
7. Inkubieren Sie für 45 min bei 60° ± 1°C in einem Wasserbad oder Heizblock.

D. SELEKTION

1. Nehmen Sie die Sondenreagenzröhrchen aus dem Wasserbad oder Heizblock. Entfernen Sie die Stopfen und bewahren Sie diese auf. Pipettieren Sie sofort 300 µl Reagenz 3 (Selektionsreagenz) in jedes Röhrchen. Verschließen Sie die Röhrchen und vortexen Sie diese bei mittlerer Geschwindigkeit für 1 bis 3 sec, um den Inhalt durchzumischen. Die gesamte Flüssigkeit sollte sich während der Inkubation auf dem Boden der Röhrchen befinden.
2. Inkubieren Sie die Sondenreagenzröhrchen für 10 min bei 60° ± 1°C in einem Wasserbad oder Heizblock.
3. Nehmen Sie die Sondenreagenzröhrchen aus dem Wasserbad oder Heizblock und lassen Sie sie für mindestens 5 min bei Raumtemperatur stehen. Entfernen Sie die Stopfen und verwerfen Sie diese. Die Röhrchen sollten innerhalb 30 min nachdem Sie aus dem Wasserbad oder Heizblock entfernt wurden, gemessen werden.

E. DETEKTION

1. Wählen Sie auf dem GEN-PROBE Luminometer das geeignete Programm.
2. Zur Säuberung der Röhrchenwand sowie zur Vermeidung von elektrostatischen Einflüssen während der Messung durch das Röhrchenmaterial selbst, sollte jedes Röhrchen vor der Messung mit einem feuchten Tuch bzw. Papier abgewischt werden. Stellen Sie die Röhrchen gemäß den Anweisungen im Handbuch in das GEN-PROBE Luminometer.
3. Nehmen Sie die Röhrchen nach der Messung aus dem luminometer.

HINWEISE ZUR TESTDURCHFÜHRUNG

A. REAGENZIEN: Das Reagenz 2 (Hybridisierungsreagenz) und die Positivkontrolle können präzipitieren. Zur Auflösung des Niederschlags die Lösung für 2 min bei 60° ± 1°C erhitzen und mischen.

B. TEMPERATUR: Die Hybridisierung und Selektion sind temperaturabhängige Reaktionen. Es muß deshalb unbedingt darauf geachtet werden, daß das Wasserbad oder der Heizblock während des gesamten Tests im angegebenen Temperaturbereich gehalten werden.

C. ZEIT: Die Hybridisierung und Selektion sind zeitabhängige Reaktionen. Die Hybridisierungsdauer sollte nicht unter 45 min liegen, jedoch 60 min nicht überschreiten. Die Sondenreagenzröhrchen während des Selektionsschrittes für mindestens 10 min, jedoch nicht länger als 12 min inkubieren.

D. WASSERBAD: Achten Sie darauf, daß der Wasserstand ausreichend hoch bleibt, um zu gewährleisten, daß sich die Reaktionslösung der Sondenreagenzröhrchen während der Reaktion vollständig im Wasser befindet.

E. VORTEXEN: Während des Arbeitsschritts SELEKTION muß besonders darauf geachtet werden, daß die Probenmischung absolut homogen ist, insbesondere nach Zugabe von Reagenz 3. Die gesamte Flüssigkeit muß sich während der Inkubationen auf dem Boden der Röhrchen befinden.

F. PROBENMEDIEN, DIE ZELLEN ENTHALTEN: Enthält die Probe eine große Anzahl an eukaryontischen Zellen (z.B. Zellsuspensionen) zentrifugieren Sie für 5 min bei 500 x g. Entfernen Sie den bei dieser niedrigen Geschwindigkeit gebildeten Überstand und verwenden Sie 1,5 ml dieses Überstandes als Probe. Beginnen Sie wieder ab Arbeitsschritt 1 des Abschnitts PROBENVORBEREITUNG.

G. VORBEREITUNG DES SEDIMENTS: Bei der Probenvorbereitung sollte mit einer Pasteurpipette so viel Überstand wie möglich von den zentrifugierten Proben abgenommen werden. Es wurde nachgewiesen, daß Überreste des Mediums zu schwachen falsch positiven Ergebnissen geführt haben. Arbeiten Sie jedoch vorsichtig, um das Mycoplasmensediment, das nicht sichtbar sein kann, nicht aufzuwirbeln.

H. PROBEN IM GRAUBEREICH:

1. Das Kulturwachstum in Gegenwart von Antibiotika kann zu einer Verringerung der Mycoplasmenkonzentration führen. Es ist empfehlenswert, die Zellen vor der Testung zweimal in antibiotikafreien Medien zu subkultivieren. Die zu testenden Medien müssen mindestens 3 Tage mit den Zellkulturzellen in Kontakt sein.
2. Die Vorbereitung einer größeren Probe erhöht proportional die Sensitivität des Tests. Das Sediment aus einem größeren Probenvolumen wird folgendermaßen vorbereitet:
   a. Nehmen Sie ein Zentrifugenröhrchen mit einem Fassungsvermögen von 10 bis 50 ml, das bei hoher Geschwindigkeit zentrifugiert werden kann. Markieren Sie sorgfältig die Stelle, an der das Sediment gebildet wird.
   b. Fügen Sie die gewonnenen Medien hinzu und zentrifugieren Sie für 15 min bei 12.000 bis 15.000 x g. Entfernen Sie vorsichtig den Überstand und verwerfen Sie diesen. Es kann sein, daß das Sediment nicht sichtbar ist, arbeiten Sie deshalb vorsichtig, um jeglichen Verlust des Sediments während dieses Arbeitsschrittes zu vermeiden.
   c. Resuspendieren Sie das Sediment in 1,5 ml steriler physiologischer Kochsalzlösung oder Zellkulturmedium und fahren Sie ab Schritt 1 des Abschnittes PROBENVORBEREITUNG fort.

ERGEBNISSE

A. INTERPRETATION DER ERGEBNISSE

Die Ergebnisse des GEN-PROBE MTC-NI SCHNELLNACHWEISSYSTEMS werden auf der Basis von Relative Light Unit (RLU)-Grenzwerten (cut-off) interpretiert. Ergebnisse, deren Lichtsignale dem positiven cut-off entsprechen oder darüber liegen, werden als positiv bewertet. Signale unterhalb des negativen cut-off Wertes werden als negativ bewertet. Liegt das Ergebnis im Graubereich, sollte der Test wiederholt werden. Proben, deren Werte wiederholt innerhalb des Graubereichs liegen, können eine sehr geringe Kontamination anzeigen und können erneut getestet werden, wie im Abschnitt HINWEISE ZUR TESTDURCHFÜHRUNG beschrieben.

	Positiv	Negativ
cut-off Werte:	> 5.000 RLU	< 3.000 RLU
Graubereich:	3.000 bis 5.000 RLU	

B. QUALITÄTSKONTROLLE UND VALIDIERUNG DER ERGEBNISSE

Die Negativkontrolle und die Positivkontrolle sollten innerhalb folgender Bereiche liegen:

Negativkontrolle: < 3.000 RLU
Positivkontrolle: 35.000-85.000 RLU

Zur Kalibrations- und Funktionskontrolle des Gerätes beachten Sie bitte das Handbuch.

LIMITIERUNGEN

Verwenden Sie diesen Test nur zum Nachweis von Bakterienkontaminationen in Zellkulturproben. Andere Bakterien außer Mycoplasmen können positiv reagieren, wenn sie während der Probenvorbereitung lysiert wurden.

Dieser Test ermöglicht keine Differenzierung der einzelnen Bakterienspezies.

Ein negatives Ergebnis schließt die Möglichkeit nicht aus, daß eine Mycoplasmenkontamination vorliegt, die unterhalb der Sensitivität des Tests liegt, welche ca. 100.000 Mycoplasmen pro ml Kulturmedium beträgt.

Dieser Test weist bestimmte andere Bakterienspezies nach, wenn sie durch die Probenvorbereitungsverfahren lysiert wurden, siehe Abschnitt PERFORMANCE. Ein positives Ergebnis zeigt in jedem Fall eine Kontamination der Zellkulturprobe an.

PERFORMANCE

Die Sonde ist mit einer großen Auswahl häufig vorkommender Spezies von *Acholeplasma, Mycoplasma, Spiroplasma* und *Ureaplasma* hybridisiert, die positive Signale bei > 10^5 Organismen ergaben.

Folgende Mycoplasma-Spezies gehören zu den mit dem GEN-PROBE MTC-NI SCHNELLNACHWEISSYSTEM getesteten Spezies.

Acholeplasma laidlawii	*Mycoplasma negroni*
Mycoplasma arginini	*Mycoplasma neurolyticum*
Mycoplasma arthritidis	*Mycoplasma orale*
Mycoplasma collis	*Mycoplasma pirum*
Mycoplasma fermentans	*Mycoplasma primatum*
Mycoplasma gallisepticum	*Mycoplasma pneumoniae*
Mycoplasma genitalium	*Mycoplasma pulmonis*
Mycoplasma hominis	*Mycoplasma sualvi*
Mycoplasma hyorhinis	*Spiroplasma species*
Mycoplasma iowae	*Ureaplasma parvum*
Mycoplasma muris	*Ureaplasma urealyticum*

Gramnegative Bakterien einer großen Vielzahl an Spezies ergeben mit der in diesem Kit enthaltenen Breitspektrum-Sonde ebenfalls positive Signale, wenn sie gemäß den Anweisungen im Abschnitt PROBENVORBEREITUNG vorbereitet werden. Die Reaktion

grampositiver Keime hängt davon ab, ob die Bakterien bei der Probenvorbereitung lysiert werden. Bei entsprechenden Lysebedingungen reagieren alle grampositiven Bakterien eines breiten Spektrums an Spezies ebenfalls mit diesem Sondensystem. Es wurde keine Reaktion gegenüber eukaryontischen Zielzellen festgestellt.

NORMALWERTE

A. PROBEN:

150 Proben wurden mit dem GEN-PROBE MTC-NI kit und dem isotopischen GEN-PROBE MTC Test getestet.

Die RLU Werte der positiven Proben lagen in einem Bereich von 7.644 bis 3.034.700 RLU.

Die RLU Werte der negativen Proben lagen in einem Bereich von 490 bis 2.963 RLU.

Es gab keine diskrepanten Proben, alle Proben, die im isotopischen Test positiv reagierten, ergaben mit diesem nicht isotopischen Test ebenfalls ein positives Ergebnis. Alle negativen Proben reagierten in beiden Tests negativ.

B. KONTROLLEN:

150 Kontrollen wurden getestet und ergaben folgende Ergebnisse:

	Anzahl Tests	RLU Werte
Negativkontrollen	81	273 bis 2.484 Mittelwert = 903 ± 371 SD
Positivkontrollen	69	35.489 bis 72.955 Mittelwert = 52.092 ± 8.283 SD

Diese Daten wurden von verschiedenen Technikern an unterschiedlichen Tagen mit mehreren Reagenzienchargen unter Verwendung verschiedener GEN-PROBE LEADER ermittelt.

FEHLERMÖGLICHKEITEN

SCHWACH POSITIVE KONTROLLE (UNTER 35.000 RLU)

A. Vergewissern Sie sich, daß das Röhrchen mit der Positivkontrolle ca. 800 µl enthält. Geringe Werte können darauf hinweisen, daß weniger als 100 µl Positivkontrolle in das Sondenröhrchen mit der Positivkontrolle hinzugegeben wurde.

B. Prüfen Sie, ob die Temperatur des Wasserbades oder Heizblocks 60° ± 1°C beträgt.

C. Vergewissern Sie sich, daß die Sondenröhrchen so im Wasserbad oder Heizblock stehen, daß der Röhrcheninhalt während der Inkubation vollständig umschlossen ist. Während des Tests darf kein Wasser oder andere nicht sterile Lösungen in die Sondenreagenzröhrchen gelangen.

D. Prüfen Sie, ob die Ablesezeit des luminometers auf 2 sec eingestellt ist.

E. Prüfen Sie die Präzision der Pipettiergeräte.

STARK POSITIVE KONTROLLE (ÜBER 85.000 RLU)

A. Vergewissern Sie sich, daß das Röhrchen mit der Positivkontrolle ca. 800 µl enthält. Hohe Werte können darauf hinweisen, daß keine 300 µl Selektionsreagenz zugegeben wurden.

B. Prüfen Sie, ob die Temperatur des Wasserbades oder Heizblocks 60° ± 1°C beträgt und ob das luminometer korrekt eingestellt ist.

C. Vergewissern Sie sich, daß die Röhrchen während des Selektionsschrittes 10 min inkubiert werden.

STARK NEGATIVE KONTROLLE (ÜBER 3000 RLU)

A. Vergewissern Sie sich, daß das Röhrchen mit der Negativkontrolle ca. 800 µl enthält. Hohe Werte können darauf hinweisen, daß keine 300 µl Selektionsreagenz zugegeben wurden.

B. Vergewissern Sie sich, daß die Temperatur des Wasserbades oder Heizblocks 60° ± 1°C beträgt und das luminometer korrekt eingestellt ist.

C. Vergewissern Sie sich, daß die Röhrchen während des Selektionsschrittes 10 min inkubiert werden.

D. Achten Sie darauf, daß die Verschlußkappen der Positivkontrollen und der Negativkontrollen NICHT VERTAUSCHT werden.

E. Vermeiden Sie eine statische Aufladung der Röhrchen, indem Sie diese mit einem feuchten Tuch abwischen, bevor Sie sie in das luminometer stellen.

PROBEN IM GRAUBEREICH (3000-5000 RLU)

A. Vergewissern Sie sich, daß die Inkubationen bei 60° ± 1°C durchgeführt werden. Verwenden Sie einen genauen Thermometer.

B. Vergewissern Sie sich, daß die Proben homogen sind und bei allen Inkubationen keine Tropfen auf der Flüssigkeitsoberfläche verbleiben.

C. Die Kulturen können mit einer sehr geringen Zahl an Bakterien kontaminiert sein. Erhöhen Sie die Sensitivität des Tests wie im Abschnitt HINWEISE ZUR TESTDURCHFÜHRUNG Punkt H beschrieben. Es kann sein, daß die Zellen nach der tiefgekühlten Lagerung mindestens zweimal subkultiviert werden müssen, um eine ausreichende Keimzahl zu erhalten.

D. Die Kulturmedien dürfen nicht vor der Zentrifugation eingefroren werden (Arbeitsschritt 2 der PROBENVORBEREITUNG).

ABWEICHUNGEN BEI DER ABLESUNG

A. Überprüfen Sie die Präzision der Pipettiergeräte.

B. Vermeiden Sie eine statische Aufladung der Röhrchen, indem Sie diese mit einem feuchten Tuch abwischen, bevor Sie sie in das luminometer stellen.

C. Vergewissern Sie sich, daß das gesamte Probensediment homogen resuspendiert wurde und das gesamte Sediment in das Sondenröhrchen transferiert wurde.

D. Prüfen Sie die Funktion der Pumpen des luminometers (siehe Handbuch). Überprüfen Sie die Kalibration des Gerätes.

E. Eine Kontamination der Röhrchen oder Reagenzien mit RNase oder Bakterien kann die Testergebnisse beeinflussen. Bei der Handhabung aller Röhrchen und Reagenzien sollte aseptisch gearbeitet werden.

DETECTION DES MYCOPLASMES DANS LES CULTURES (MTC-NI)
SYSTEME DE DETECTION RAPIDE

(bioMérieux Réf. 39503 / Gen-Probe Cat No. 104573)

UTILISATION

Le SYSTEME GEN-PROBE DE DETECTION RAPIDE DES MYCOPLASMES DANS LES CULTURES CELLULAIRES (MTC-NI) est un produit qui permet de détecter la présence de contamination par les mycoplasmes dans les cultures cellulaires.

Pour usage en laboratoire.

INTRODUCTION

Les espèces du genre *Mycoplasma* constituent une importante source de contamination des cultures cellulaires.

Les mycoplasmes qui se développent sur les cultures cellulaires peuvent atteindre des concentrations de 10^8 UFC (Unité Formant Colonie) par millilitre de surnageant. En outre, les mycoplasmes peuvent se fixer sur les membranes cellulaires (1, 4).

Les mycoplasmes, qui sont dépourvus de paroi cellulaire, ne modifient pas la turbidité des cultures cellulaires et ne peuvent donc être détectés visuellement. Ces micro-organismes sont résistants aux antibiotiques qui agissent sur la paroi cellulaire, ce qui rend difficile l'éradication de la contamination.

Les conséquences de la contamination des cultures par les mycoplasmes ont été décrites par Barile et son équipe (2) et par McGarrity et Kotani (6). Il a été démontré qu'il pouvait y avoir jusqu'à 15% de lignées cellulaires infectées après passages. Il est par conséquent recommandé de tester toutes les lignées cellulaires une fois par mois, afin de vérifier la dissémination de l'infection (3, 6, 9).

Lorsqu'ils sont présents dans une culture, les mycoplasmes sont une source d'interférences pour l'étude des paramètres cellulaires. Ils peuvent faire apparaître des anomalies chromosomiques et provoquer des variations antigéniques sur les membranes cellulaires. Ils peuvent également affecter le métabolisme cellulaire car ils utilisent les substances nutritives destinées aux cellules. Enfin, ils peuvent avoir une influence sur les mécanismes de fusion cellulaire (8).

Il a été démontré que 98% des contaminations dans les laboratoires étaient dues à six espèces appartenant aux genres *Mycoplasma* et *Acholeplasma* (5). Ces espèces sont:

Acholeplasma laidlawii	*Mycoplasma hyorhinis*
Mycoplasma orale	*Mycoplasma salivarium*
Mycoplasma arginini	*Mycoplasma hominis*

Mycoplasma hyorhinis est à l'origine de 30 à 40% des infections dans certains laboratoires.

Les méthodes habituellement utilisées pour la détection des mycoplasmes reposent sur la culture et sur l'identification biochimique. La culture des mycoplasmes peut prendre jusqu'à trois semaines. Elle est difficile car doit être réalisée sur milieu spécifique et en atmosphère micro-aérophile. En outre, certaines espèces ne peuvent pas être cultivées selon les méthodes de routine.

Le SYSTEME GEN-PROBE MTC-NI DE DETECTION RAPIDE utilise le principe d'hybridation des acides nucléiques et l'ARN ribosomal (ARNr) pour la détection des mycoplasmes dans les cultures cellulaires(10). Les échantillons positifs peuvent être détectés en 75 minutes. Le coffret MTC-NI GEN-PROBE contient une sonde bactérienne qui permet de détecter toutes les espèces de *Mycoplasma* et d'*Acholeplasma* susceptibles de contaminer les cultures cellulaires ainsi que toutes les espèces bactériennes qui peuvent être présentes.

PRINCIPES

Les tests par hybridation d'acides nucléiques sont basés sur la capacité de brins complémentaires d'acides nucléiques à s'apparier de manière spécifique pour former des complexes bicaténaires stables. Le SYSTEME GEN-PROBE MTC-NI DE DETECTION RAPIDE utilise une sonde ADN monocaténaire, complémentaire de l'ARNr de l'organisme cible. Lorsque l'ARNr de l'organisme cible est libéré, la sonde s'hybride avec celui-ci pour former un complexe ADN:ARN stable. Les sondes hybridées sont alors séparées des sondes non hybridées. Le Réactif de Sélection permet de différencier les sondes hybridées des non-hybridées. Les hybrides ARN:ADN marqués sont mesurés à l'aide du Luminomètre GEN-PROBE (7). Un résultat positif est une lecture du luminomètre donnant une valeur égale ou supérieure à la valeur seuil. Une valeur au-dessous du seuil donne un résultat négatif.

REACTIFS

Les réactifs utilisés pour le SYSTEME GEN-PROBE MTC-NI DE DETECTION RAPIDE sont fournis en deux coffrets distincts:

COFFRET MTC-NI GEN-PROBE (bioMérieux Réf. 39503 / Gen-Probe Cat No. 104573)	**50 Tests**
Réactif 1 (Réactif Sonde) (P)	5 x 10 tubes
Contrôle positif (PC)	1 x 2,5 ml solution d'ARN tamponnée
Réactif 2 (Réactif d'Hybridation) (H)	1 x 15 ml solution tamponnée
Réactif 3 (Réactif de Sélection) (S)	1 x 20 ml solution tamponnée

COFFRET DE REACTIFS DE DETECTION GEN-PROBE
(bioMérieux Réf. 39300 / Gen-Probe Cat No. 201791)

Réactif de détection I (RI) 1 x 240 ml
0,1% de péroxyde d'hydrogène dans acide nitrique 0,001 N

Réactif de détection II (RII) 1 x 240 ml
Hydroxyde de sodium 1 N.

MATÉRIEL REQUIS MAIS DISPONIBLE SÉPARÉMENT
Bain-marie ou bloc chauffant (60° ± 1°C)
Micropipettes (100 µl, 300 µl)
Pipettes répétitives (300 µl)
Vortex
Microcentrifugeuse (12.000-15.000 x g)
Tubes pour microcentrifugeuse (2 ml)

DISPONIBLE AUPRÈS DES DISTRIBUTEURS GEN-PROBE
GEN-PROBE Luminomètre (LEADER 50i)
(bioMérieux Réf. 39400 / Gen-Probe Cat. No. 103100i)

GEN-PROBE Coffret de Réactifs de Détection
(bioMérieux Réf. 39300 / Gen-Probe Cat. No. 201791)

GEN-PROBE Bloc chauffant (60° ± 1°C)
(bioMérieux Réf. 39406 / Gen-Probe Cat. No. 302902 ou 302903)

PRECAUTIONS D'UTILISATION
A. Usage réservé aux laboratoires. Ne pas utiliser pour le diagnostic.
B. Utiliser les précautions d'usage lors de la réalisation de ce test.
C. A utiliser pour la détection de la contamination par les mycoplasmes des cultures cellulaires.
D. Utiliser uniquement le matériel fourni ou du matériel de laboratoire.
E. Eviter le contact des Réactifs de Détection I et II avec la peau, les yeux et les muqueuses. En cas de contact, rincer à l'eau. Si ces réactifs sont renversés, les diluer avec de l'eau avant d'essuyer.

CONSERVATION
Les Tubes de Réactifs Sonde doivent être conservés dans leur sachet en aluminium à 2° - 8°C. Ils sont stables avant ouverture jusqu'à la date d'expiration. Après ouverture, le sachet doit être refermé et conservé à 2° - 8°C et les tubes doivent être utilisées dans le mois qui suit l'ouverture et avant la date de péremption.

Le contrôle positif doit être conservé à 2° - 8°C et chauffé en agitant doucement à 60°C pendant 2 minutes avant utilisation.

Les autres réactifs du coffret MTC-NI peuvent être conservés entre 2° - 25°C et sont stables jusqu'à la date de péremption.

Les étiquettes du réactifs MTC-NI comportent les symboles suivants pour la conservation:

Date de péremption Numéro de lot

Limites de température

Les symboles se réfèrent à la norme européenne aux recommandations.

NE PAS CONGELER LES REACTIFS.

PREPARATION DE L'ECHANTILLON
Le SYSTEME GEN-PROBE DE DETECTION RAPIDE DES MYCOPLASMES (MTC-NI) est conçu pour détecter la contamination par les mycoplasmes des tissus cellulaires. Les suspensions cellulaires peuvent également être testées. Le test peut être pratiqué sur des cultures réalisées dans des milieux contenant des antibiotiques, mais la concentration de mycoplasmes sera plus faible. Il est recommandé de transférer les cellules successivement dans deux milieux ne contenant pas d'antibiotique avant de les tester. Les milieux testés doivent avoir été en contact avec les cellules pendant au moins trois jours. Se référer au paragraphe REMARQUES pour l'analyse d'échantillons ne répondant pas à ces critères. Si nécessaire, les échantillons peuvent être conservés 7 jours à 4°C avant de subir le test. Pour une plus grande sensibilité des échantillons, ils doivent être préparés moins de 4 heures après le prélèvement. En cas d'impossibilité, les milieux peuvent être conservés à 2° - 8°C pendant un maximum de 3 jours. Les échantillons peuvent être archivés ou conservés pour des essais ultérieurs en procédant jusqu'à l'étape 3 de la PREPARATION DE L'ECHANTILLON. Le tampon d'hybridation devra être ajouté au culot et l'échantillon conservé à -20°C ou au dessous, pour un mois.

NOTE: Les échantillons troubles sont probablement contaminés par des levures ou par un autre type de bactéries et doivent être éliminés.

MODE OPERATOIRE

A. PREPARATION DE L'APPAREILLAGE

1. Régler la température du bloc chauffant ou du bain-marie à 60° ± 1°C.
2. Préparer le luminomètre GEN-PROBE. S'assurer que les volumes des réactifs de Détection I et II sont suffisant pour effectuer les tests.

B. PREPARATION DE L'ECHANTILLON

1. Transférer à la pipette 1,5 ml de culture cellulaire dans un tube pour microcentrifugeuse. Identifier en marquant le côté du tube sur lequel le culot sera réalisé. Pour les échantillons contenant plus de 1 million de cellules eucaryotes, vous référer au paragraphe REMARQUES.
2. Centrifuger à 12.000-15.000 x g pendant 10 minutes. Enlever et éliminer le surnageant avec une pipette Pasteur. Le culot peut ne pas être visible et des précautions sont à prendre pour éviter sa perte lors de l'élimination du surnageant.
3. Ajouter 100 µl de Réactifs d'Hybridation dans le tube de microcentrifugation. Agiter vigoureusement le mélange au Vortex. (Ces échantillons peuvent être conservés à -20°C ou au-dessous pendant un mois. Les échantillons congelés doivent être chauffés à 60° ± 1°C pendant 2 minutes. Avant utilisation, mélanger à l'aide d'un Vortex pour obtenir une solution homogène.)

C. HYBRIDATION

1. Découper horizontalement la partie supérieure du sachet en aluminium. Retirer le nombre nécessaire de tubes de Réactifs Sonde pour tester les échantillons et/ou les souches de contrôle. Refermer le sachet hermétiquement en rabattant plusieurs fois son extrémité et en la fixant par un ruban adhésif ou une pince. Ne pas retirer le sachet déssicant et conserver le sac fermé à 2° - 8°C.
2. Etiqueter un nombre suffisant de tubes de Réactif Sonde pour tester les échantillons et les souches de contrôle. Oter et conserver les bouchons.
3. Distribuer 100 µl de Réactif d'Hybridation au fond des tubes de Contrôle Négatif.
4. Distribuer 100 µl de Contrôle Positif dans le fond des tubes de Contrôle Positif.
5. Distribuer 100 µl de chaque échantillon dans le fond des tubes échantillon approprié.
6. Reboucher tous les tubes et agiter à vitesse modérée le mélange au Vortex pendant 1 à 3 secondes. Durant toute l'incubation, tous les échantillons devront être au fond des tubes.
7. Incuber pendant 45 minutes à 60° ± 1°C dans un bain-marie ou un bloc chauffant.

D. SELECTION

1. Retirer les tubes de Réactif Sonde du bain-marie ou du bloc chauffant. Retirer et conserver les bouchons. Distribuer immédiatement 300 µl de Réactif 3 (Réactif de Sélection) dans chaque tube. Refermer les tubes et agiter le mélange à l'aide d'un Vortex pendant 1 à 3 secondes. Durant l'incubation, tous les échantillons devront être au fond des tubes.
2. Incuber les tubes de Réactif Sonde pendant 10 minutes à 60° ± 1°C dans un bain-marie ou un bloc chauffant.
3. Retirer les tubes de Réactif Sonde du bain-marie ou du bloc chauffant et les laisser à température ambiante au moins 5 minutes. Oter et jeter les bouchons. Lire les résultats à l'aide du Luminomètre GEN-PROBE dans la demi-heure qui suit.

E. DETECTION

1. Sélectionner le protocole approprié sur le Luminomètre GEN-PROBE.
2. Afin de retirer tout résidu de la surface des tubes, les essuyer à l'aide de papier absorbant humide. Placer ensuite les tubes dans le Luminomètre GEN-PROBE et suivre les instructions du manuel d'utilisation.
3. Lorsque l'analyse est terminée, retirer les tubes du Luminomètre GEN-PROBE.

REMARQUES

A. REACTIF: Le Réactif 2 (Réactif d'Hybridation) et le Contrôle Positif peuvent précipiter. Chauffer et mélanger à 60° ± 1°C pendant 2 minutes pour dissoudre ce précipité.

B. TEMPERATURE: Les étapes d'Hybridation et de Sélection sont des réactions thermo-dépendantes. Par conséquent, il est impératif de maintenir le bain-marie ou le bloc chauffant à la température préconisée durant tout le test.

C. DUREE: Les étapes d'Hybridation et de Sélection sont des réactions dépendantes du temps. L'Hybridation doit durer au moins 45 minutes mais pas plus de 60 minutes. Pendant l'étape de SELECTION, incuber les tubes Réactif Sonde pendant au moins 10 minutes mais pas plus de 12 minutes.

D. BAIN-MARIE: Le niveau d'eau doit être maintenu de manière à ce que la totalité du liquide réactionel contenu dans les tubes de Réactifs Sonde soit immergée.

E. UTILISATION DU VORTEX: Il est important d'avoir un mélange homogène lors de l'étape de SELECTION, plus particulièrement lors de l'addition du Réactif 3. Tous les mélanges doivent être au fond du tube pendant les incubations.

F. ECHANTILLONS DE MILIEUX CONTENANT DES CELLULES: Si un grand nombre de cellules eucaryotes est présent dans l'échantillon (à savoir des suspensions de cellules), centrifuger à 500 x g pendant 5 minutes. Retirer le surnageant formé et transférer 1,5 ml de celui-ci comme échantillon. Reprendre l'étape 1 de la PREPARATION DE L'ECHANTILLON.

G. PREPARATION DU CULOT: Lors de la préparation des échantillons, retirer un maximum de surnageant des échantillons centrifugés avec une pipette Pasteur. Il a été prouvé que des débris de milieux engendrent des faux positifs bas. Cependant, prendre garde de ne pas troubler le culot de mycoplasmes qui peut ne pas être visible.

H. ECHANTILLONS EN ZONE D'INCERTITUDE:

1. La croissance des cultures en présence d'antibiotiques peut réduire la concentration des mycoplasmes. Il est recommandé de transférer les cellules dans deux milieux consécutifs ne contenant pas d'antibiotiques avant de les tester. Les milieux testés doivent avoir été en contact avec les cellules pendant au moins trois jours.
2. La préparation d'un grand nombre d'échantillon favorise la sensibilité du test. Pour préparer un culot pour un grand nombre d'échantillon, faire comme suit:
   a. Prendre un tube à centrifuger qui puisse contenir de 10 à 50 ml et qui puisse supporter une centrifugation à grande vitesse. Marquer soigneusement la position du culot lorsqu'il se formera.
   b. Ajouter les milieux prélevés et centrifuger de 12.000 à 15.000 x g pendant 15 minutes. Décanter soigneusement le surnageant et l'éliminer. Le culot peut ne pas être visible et toute précaution durant cette étape doit être prise pour le préserver.
   c. Remettre le culot en suspension dans 1,5 ml de sérum physiologique stérile ou de milieux de culture cellulaire et procéder à l'étape 1 de la PREPARATION DE L'ECHANTILLON.

RESULTATS

A. INTERPRETATION DES RESULTATS

Les résultats du SYSTEME GEN-PROBE MTC-NI DE DETECTION RAPIDE sont interprétés en fonction de valeurs seuils RLU (Relative Light Unit). Les échantillons produisant un signal lumineux de valeur supérieure ou égale à ce seuil sont considérés comme positifs. Les signaux lumineux inférieures à ce seuil sont considérés comme négatifs. Lorsque le résultat est situé dans la zone d'incertitude, le test doit être répété. Si la seconde analyse donne toujours des résultats équivoques induisant un faible contamination, il faut la retester comme décrit dans le paragraphe REMARQUES.

	Positive	Negative
Valeur seuil:	> 5.000 RLU	< 3.000 RLU
Zone d'incertitude:	3.000 à 5.000 RLU	

B. CONTROLE DE QUALITE ET ACCEPTABILITE DES RESULTATS

Les contrôles négatifs et positifs doivent satisfaire aux valeurs suivantes:

Contrôle négatif: < 3.000 RLU
Contrôle positif: 35.000-85.000 RLU

Pour vérifier la calibration machine et son fonctionnement, merci de vous référer au manuel opératoire.

LIMITES DU TEST

A utiliser uniquement pour la détection d'une contamination bactérienne dans les échantillons de cultures cellulaires. Des bactéries, autres que les mycoplasmes, peuvent induire une réaction positive si elles sont lysées au cours de la préparation de l'échantillon.

Ce test ne permet pas de différencier les espèces bactériennes.

Un résultat négatif ne peut pas exclure la possibilité d'une contamination à mycoplasmes à une concentration en dessous du taux de sensibilité qui est approximativement de 100.000 mycoplasmes par ml de milieux de culture.

Ce test détectera certaines autres espèces bactériennes si elles sont lysées au cours de la préparation de l'échantillon, se référer au paragraphe PERFORMANCE DU TEST. Dans tous les cas, un résultat positif indiquera une contamination de l'échantillon de culture cellulaire.

PERFORMANCE DU TEST

L'hybridation de la sonde avec un large éventail d'espèces communément trouvés de *Acholeplasma, Mycoplasma, Spiroplasma*, et *Ureaplasma* ont donné des signaux positifs à > 10^5 organismes.

Les espèces suivantes de mycoplasmes sont parmi celles testées avec le SYSTEME GEN-PROBE MTC-NI DE DETECTION RAPIDE.

Acholeplasma laidlawii	*Mycoplasma negroni*
Mycoplasma arginini	*Mycoplasma neurolyticum*
Mycoplasma arthritidis	*Mycoplasma orale*
Mycoplasma collis	*Mycoplasma pirum*
Mycoplasma fermentans	*Mycoplasma primatum*
Mycoplasma gallisepticum	*Mycoplasma pneumoniae*
Mycoplasma genitalium	*Mycoplasma pulmonis*
Mycoplasma hominis	*Mycoplasma sualvi*
Mycoplasma hyorhinis	*Spiroplasma species*
Mycoplasma iowae	*Ureaplasma parvum*
Mycoplasma muris	*Ureaplasma urealyticum*

Les organismes Gram négatif provenant d'une grande variété de taxons produisent aussi des signaux positifs avec la sonde bactérienne à large spectre utilisée dans ce coffret lors de la préparation comme décrit dans le paragraphe Préparation de l'Echantillon. La réaction avec des microorganismes Gram positifs dépend de la capacité de lyse des bactéries au cours de la préparation de l'échantillon. En utilisant des conditions de lyse appropriées, tout organisme Gram positif d'une grande variété de taxons peuvent aussi réagir avec ce système sonde. Aucune réaction avec des cellules eukaryotes cibles n'a été observée.

VALEURS ATTENDUES

A. ECHANTILLONS:

Cent cinquante échantillons ont été testés avec le coffret GEN-PROBE MTC-NI et le test isotopique GEN-PROBE MTC.

Les valeurs seuils pour les échantillons positifs varient de 7.644 à 3.034.700 RLU.

Les valeurs seuils pour les échantillons négatifs varient de 490 à 2.963 RLU.

Il n'y a pas d'échantillon discordant, tous les échantillons positifs par le test isotopique le sont aussi par le test non-isotopique. Tous les échantillons négatifs ont été trouvé négatifs dans l'ensemble des tests.

B. CONTROLES:

Cent cinquante contrôles ont été testés et les résultats sont les suivants:

	Nombre d'observations	Valeurs seuils RLU
Contrôles négatifs	81	273 à 2.484 moyenne = 903 ± 371 SD
Contrôles positifs	69	35.489 à 72.955 moyenne = 52.092 ± 8.283 SD

Ces données ont été rendues par plusieurs techniciens à des jours différents avec des lots de réactifs différents utilisant des LEADERS GEN-PROBE différents.

RESOLUTION D'INCIDENTS

CONTRÔLE POSITIF BAS (< 35.000 RLU)

A. Contôler que le tube de contrôle positif contient approximativement 800 µl. Des valeurs de lecture faibles peuvent indiquer que moins de 100 µl de Contrôle positif a été ajouté dans le tube Sonde Contrôle Positif.

B. Vérifier que la température du bain-marie ou du bloc chauffant est de 60° ± 1°C.

C. S'assurer que le tube de Réactif Sonde soit immergé dans le bain-marie ou le bloc chauffant afin que le liquide réactionnel soit complètement recouvert. Pendant le test, éviter toute entrée d'eau ou de solution non stérile dans les tubes sonde.

D. Régler le luminomètre pour un temps de lecture à 2 secondes.

E. Vérifier le matériel de pipetage.

CONTRÔLE POSITIF HAUT (> 85.000 RLU)

A. Contrôler que le tube de contrôle positif contient approximativement 800 µl. Des valeurs de lecture hautes peuvent indiquer que 300 µl de réactif de sélection n'a pas été ajouté.

B. Vérifier que la température du bain-marie ou du bloc chauffant est de 60° ± 1°C et que le luminomètre fonctionne correctement.

C. S'assurer que les tubes sont incubés 10 minutes pendant l'étape de Sélection.

CONTRÔLE NEGATIF HAUT (> 3000 RLU)

A. Contrôler que le tube de contrôle négatif contient approximativement 800 µl. Des valeurs de lecture hautes peuvent indiquer que 300 µl de réactif de sélection n'a pas été ajouté.

B. Vérifier que la température du bain-marie ou du bloc chauffant est de 60° ± 1°C et que le luminomètre fonctionne correctement.

C. S'assurer que les tubes sont incubés 10 minutes pendant l'étape de SÈLECTION.

D. NE PAS interchanger les bouchons des contrôles négatifs et positifs.

E. Eliminer les charges statiques en essuyant les flacons avec du papier absorbant ou du tissu humide avant de les placer dans le luminomètre.

ECHANTILLONS DANS LA ZONE D'INCERTITUDE (3000-5000 RLU)

A. Vérifier que la température des incubations est de 60° ± 1°C. Un thermomètre doit être utilisé.

B. Vérifier que l'échantillon est homogène et qu'aucune goutte ne remonte à la surface du liquide lors des incubations.

C. Les cultures ont pu être contaminées avec une concentration très basse de bactéries. Augmenter la sensibilité du test comme décrit dans le paragraphe REMARQUES - H. Des cellules ont peut-être besoin de subir deux subcultures après les avoir retirées de la congélation afin d'avoir un nombre suffisant de bactéries pour la détection.

D. Les milieux de culture ne peuvent pas être congelés avant la centrifugation, étape 2 du paragraphe PREPARATION DE L'ECHANTILLON.

LECTURES VARIABLES

A. Vérifier le fonctionnement du matériel de pipetage.

B. Eliminer les charges statiques en essuyant les flacons avec du papier absorbant ou du tissu humide avant de les placer dans le luminomètre.

C. S'assurer que la totalité du culot de l'échantillon est de nouveau en suspension de façon homogène et qu'il a été transféré dans le tube sonde.

D. Vérifier le fonctionnement des pompes du luminomètre comme indiqué dans le manuel Instrument. Vérifier la calibration de l'instrument.

E. La contamination des tubes ou des réactifs avec RNase ou des bactéries peut affecter les résultats du test. Utiliser une technique aseptique lors de la manipulation des tubes et des réactifs.

CULTIVO TISULAR NI DE MICOPLASMA (MTC-NI)
SISTEMA DE DETECCION RAPIDA

(bioMérieux ref. 39503 / Gen-Probe Cat. No. 104573)

UTILIZACION

El SISTEMA GEN-PROBE DE DETECCION RAPIDA DE MICOPLASMAS EN CULTIVOS CELULARES (MTC-NI) es un producto que permite detectar la presencia de contaminación por micoplasmas en cultivos celulares.

Para uso en laboratorio.

RESUMEN Y EXPLICACION DEL TEST

Las especies del género *Mycoplasma* son una fuente de contaminación de cultivos celulares. Los micoplasmas se desarrollan hasta alcanzar elevados títulos en los cultivos celulares, con concentraciones de hasta 10^8 unidades formadoras de colonias por mililitro de sobrenadante. Además, pueden encontrarse micoplasmas adheridos a las membranas celulares (1, 4).

Estos organismos, que carecen de pared celular, no producen habitualmente turbidez en los cultivos celulares y no pueden, por lo tanto, ser detectados visualmente. Los micoplasmas son resistentes a los antibióticos que actúan sobre la pared celular y por lo tanto son difíciles de eliminar de los cultivos celulares.

La incidencia y los efectos de la contaminación con micoplasmas en los cultivos celulares han sido descritos por Barile y col. (2) y por McGarrity y Kotani (6). Se ha demostrado que puede haber hasta un 15% de líneas celulares infectadas después de hacer pases Por lo tanto, se recomienda estudiar todas las líneas celulares cada mes con el fin de controlar la diseminación de la contaminación (3, 6, 9).

Cuando están presentes en un cultivo, los micoplasmas interfieren con los parámetros celulares de la investigación. Los micoplasmas pueden inducir anormalidades cromosómicas y alterar la antigenicidad de las membranas celulares. Pueden afectar el metabolismo de las células, compitiendo por los nutrientes y ejerciendo influencia sobre los procesos de fusión celular (8).

Se ha demostrado que seis especies de los géneros *Mycoplasma* y *Acholeplasma* producen el 98% de las infecciones de laboratorio (5). Estas especies son:

Acholeplasma laidlawii	*Mycoplasma hyorhinis*
Mycoplasma orale	*Mycoplasma salivarium*
Mycoplasma arginini	*Mycoplasma hominis*

de las cuales *Mycoplasma hyorhinis* causa el 30-40% de las infecciones en algunos laboratorios.

Los primeros métodos para la detección de micoplasmas se basaron en el cultivo o en procedimientos bioquímicos. El cultivo de micoplasmas puede exigir hasta tres semanas y es difícil dada su exigencia de condiciones de crecimiento microaerófílas y de medios de cultivo especializados. Además, algunas especies no pueden ser cultivadas mediante métodos rutinarios.

El SISTEMA GEN-PROBE DE DETECCION RAPIDA MTC-NI emplea el principio de hibridación de ácidos nucleicos y de detección del ARN ribosómico (ARNr) (10). Es posible detectar muestras positivas en 75 minutos. El kit MTC-NI GEN-PROBE utiliza una sonda exclusivamente bacteriana que detecta todas las especies de *Mycoplasma* y *Acholeplasma* que infectan habitualmente los cultivos celulares, así como otras especies bacterianas que puedan encontrarse presentes.

PRINCIPIO DE LA TECNICA

Los ensayos con hibridación del ácido nucleico se basan en la capacidad de cadenas complementarias de ácido nucleico para unirse y formar complejos bicatenarios estables. El SISTEMA GEN-PROBE DE DETECCION RAPIDA MTC-NI utiliza una sonda de ADN monocatenario marcada con quimioluminiscencia, complementaria del ARNr del organismo diana. Después que el organismo ha liberado el ARN ribosómico, la sonda de ADN marcado se combina con el ARNr del organismo diana para formar un híbrido estable ADN:ARN. El Reactivo de Selección permite diferenciar las sondas no hibridadas de las sondas hibridadas. Los híbridos ADN:ARN marcados son medidos en un Luminómetro GEN-PROBE (7). Un resultado positivo es una lectura del Luminómetro GEN-PROBE igual o superior al umbral. Un valor por debajo de este umbral es un resultado negativo.

REACTIVOS

Los reactivos del SISTEMA GEN-PROBE DE DETECCION RAPIDA MTC-NI son suministrados en dos kits de reactivos separados:

KIT MTC-NI GEN-PROBE (bioMérieux ref. 39503 / Gen-Probe Cat. No. 104573)	**50 Tests**
Reactivo 1 (Reactivo Sonda) (P)	5 x 10 tubos
Control Positivo (PC)	1 x 2,5 ml solución de ARN tamponada
Reactivo 2 (Reactivo de Hibridación) (H)	1 x 15 ml solución tamponada
Reactivo 3 (Reactivo de Selección) (S)	1 x 20 ml solución tamponada

KIT DE REACTIVOS DE DETECCION GEN-PROBE (bioMérieux ref. 39300 / Gen-Probe Cat No. 201791)	
Reactivo de Detección I (RI) peróxido de hidrógeno al 0,1% en ácido nítrico 0,001 N	1 x 240 ml
Reactivo de Detección II (RII) hidróxido de sodio 1 N.	1 x 240 ml

MATERIALES NECESARIOS PERO NO SUMINISTRADOS

Baño maría o bloque calefactor (60° ± 1°C)
Micropipetas (100 µl, 300 µl)
Pipetas de repetición (300 µl)
Mezclador Vortex
Microcentrífuga (12.000-15.000 x g)
Tubos de microcentrífuga (2 ml)

DISPONIBLES EN SU DISTRIBUIDOR GEN-PROBE

Luminómetro LEADER GEN-PROBE 50i
(bioMérieux ref. 39400 / Gen-Probe Cat. No. 103100i)

Kit de Reactivos de Detección GEN-PROBE
(bioMérieux ref. 39300 / Gen-Probe Cat. No. 201791)

Bloque calefactor GEN-PROBE (60° ± 1°C)
(bioMérieux ref. 39406 / Gen-Probe Cat. No. 302902 o 302903)

CUIDADOS DE UTILIZACION

A. Sólo para uso en laboratorio. No utilizar para el diagnóstico.

B. Utilizar las precauciones habituales cuando se realiza este ensayo.

C. Utilizar para la detección de contaminación con micoplasmas en cultivos tisulares.

D. Utilizar sólo el material de laboratorio suministrado o el material desechable especificado.

E. Evitar el contacto de los Reactivos de Detección I y II con la piel, los oros y las membranas mucosas. Lavar con agua si estos reactivos entran en contacto con la piel. Si se derraman estos reactivos, diluir con agua antes de secar.

CONSERVACION

Los tubos del Reactivo Sonda deben ser conservados en las bolsas de aluminio entre 2° y 8°C. Los tubos del Reactivo Sonda son estables en las bolsas cerradas hasta la fecha de caducidad indicada. Una vez abiertas, las bolsas deben ser cerradas nuevamente, conservadas entre 2° y 8°C, y los tubos deben ser utilizados en el mes siguiente a su apertura y antes de la fecha de caducidad.

El control positivo debe ser conservado entre 2° y 8°C y calentado agitando suavemente a 60°C durante 2 minutos antes de utilizarlo.

Otros reactivos utilizados en el kit MTC-NI deben ser conservados entre 2° y 25°C y son estables hasta la fecha de caducidad indicada.

Las etiquetas de los reactivos MTC-NI incluyen los siguientes símbolos estándar para las instrucciones de conservación y manipulación:

Fecha de caducidad Número de lote a

Límite de temperatura

Los símbolos se basan en la norma europea en las recomendaciones.

NO CONGELAR LOS REACTIVOS.

PREPARACION DE LA MUESTRA

El SISTEMA GEN-PROBE DE DETECCION RAPIDA MTC-NI ha sido diseñado para detectar la contaminación de los cultivos de tejidos con micoplasmas. Las suspensiones celulares de los cultivos de tejidos pueden ser analizadas utilizando este método. El test puede ser realizado en cultivos desarrollados en medios que contengan antibióticos, pero los niveles de micoplasmas estarán reducidos. Se recomienda transferir las células sucesivamente dos veces en dos medios sin antibióticos antes de ser analizadas. Los medios por analizar deben haber estado expuestos a las células por lo menos durante tres días. Remitirse a las FICHAS TECNICAS SOBRE EL PROCEDIMIENTO para el procesamiento de las muestras que no cumplan estos criterios. Si es necesario, las muestras pueden conservarse 7 dias a 4°C antes de realizar el test. Para obtener la máxima sensibilidad, las muestras deben ser preparadas en las 4 horas que siguen a la toma de muestra. Si esto no es posible, los medios de cultivo deben ser conservados entre 2° y 8°C durante no más de 3 días. Las muestras pueden ser archivadas o almacenadas para analizarlas posteriormente, procediendo a la etapa 3 de la PREPARACION DE LAS MUESTRAS. Debe añadirse tampón de hibridación al sedimento y la muestra debe conservarse a -20°C o menos durante un mes.

NOTA: Las muestras que están visiblemente turbias pueden haber sido contaminadas con levaduras u otras bacterias y deben ser descartadas.

TECNICA

A. PREPARACION DEL EQUIPO

1. Ajustar el bloque calefactor o baño maría a 60° ± 1°C.
2. Preparar el Luminómetro GEN-PROBE. Verificar que hay un volumen suficiente de Reactivos de Detección I y II para efectuar los tests.

B. PREPARACION DE LAS MUESTRAS

1. Pipetear 1,5 ml de medio de cultivo tisular en un tubo de microcentrífuga. Identificar y marcar el lado del tubo en el cual se formará el residuo. Para muestras que contengan más de 1 millón de células eucarióticas, remitirse a las FICHAS TECNICAS SOBRE EL PROCEDIMIENTO.
2. Centrifugar a 12.000-15.000 x g durante 10 minutos. Retirar todo el sobrenadante con una pipeta Pasteur y desecharlo. El residuo puede no ser visible y se debe tener cuidado de no perder el sedimento cuando se retira el sobrenadante.
3. Añadir 100 µl de Reactivo de Hibridación al tubo de microcentrífuga. Agitar vigorosametn en el Vortex para homogeneizar bien. (Estas muestras pueden ser conservadas a -20°C o menos durante 1 mes. Las muestras congeladas deben ser calentadas a 60° ± 1°C durante 2 minutos y agitadas en el Vortex para homogeneizarlas antes de utilizarlas en el ensayo.)

C. HIBRIDACION

1. Abrir la bolsa de aluminio cortando por la la parte superior de la bolsa. Retirar un número suficiente de tubos de Reactivo Sonda para analizar las muestras y/o los controles. Volver a cerrar la bolsa doblando varias veces la parte superior y asegurándola con una cinta adhesiva o una pinza. Dejar la bolsa desecante en la bolsa y conservar la bolsa vuelta a cerrar entre 2° y 8°C.
2. Colocar una etiqueta en un número suficiente de tubos de Reactivo Sonda para las muestras y controles. Retirar y conservar los tapones.
3. Pipetear 100 µl de Reactivo de Hibridación en el fondo de los tubos de Control Negativo.
4. Pipetear 100 µl de Control Positivo en el fondo de los tubos de Control Positivo.
5. Pipetear 100 µl de cada muestra en el fondo de un tubo de muestra adecuadamente etiquetado.
6. Volver a cerrar todos los tubos y mezclar en el Vortex a velocidad moderada durante 1 a 3 segundos. Todo el líquido debe encontrarse en el fondo de los tubos durante la incubación.
7. Incubar durante 45 minutos a 60° ± 1°C en baño maría o bloque calefactor.

D. SELECCION

1. Retirar los tubos de Reactivo Sonda del baño maría o del bloque calefactor. Retirar y conservar los tapones. Pipetear de inmediato 300 µl de Reactivo 3 (Reactivo de Selección) en cada tubo. Volver a cerrar los tubos y mezclar en Vortex a velocidad moderada durante 1 a 3 segundos. Todo el líquido debe estar en el fondo de los tubos durante la incubación.
2. Incubar los tubos de Reactivo Sonda durante 10 minutos a 60° ± 1°C en baño maría o en bloque calefactor.
3. Retirar los tubos de Reactivo Sonda del baño maría o del bloque calefactor y dejarlos a la temperatura ambiente por lo menos durante 5 minutos. Retirar y eliminar los tapones. Leer los resultados en el Luminómetro GEN-PROBE en los 30 minutos siguientes a sacarlos del baño maría o del bloque calefactor.

E. DETECCION

1. Seleccionar el protocolo apropiado en el menú del software del Luminómetro GEN-PROBE.
2. Utilizando un paño húmedo o una toalla de papel, limpiar todos los tubos para verificar que no existen residuos en la parte exterior del tubo e insertar el tubo en el Luminómetro GEN-PROBE conforme a las instrucciones del instrumento.
3. Una vez completado el análisis, retirar el o los tubos del luminómetro.

OBSERVACIONES

A. REACTIVO: El Reactivo 2 (Reactivo de Hibridación) y el Control Positivo pueden precipitar. Calentar y mezclar la solución a 60° ± 1°C durante 2 minutos para disolver este precipitado.

B. TEMPERATURA: Las reacciones de Hibridación y Selección son termodependientes. Por lo tanto, es imperativo que el baño maría o el bloque calefactor se mantengan dentro del rango de temperatura especificado durante toda la prueba.

C. TIEMPO: Las reacciones de Hibridación y Selección son cronodependientes. Hibridar por lo menos durante 45 minutos pero no más de 60 minutos. Incubar los tubos del Reactivo Sonda durante la etapa de SELECCIÓN por lo menos durante 10 minutos pero no más de 12 minutos.

D. BAÑO MARIA: El nivel de agua en el baño maría debe mantenerse, verificando que la mezcla de reacción líquida en el tubo del Reactivo Sonda se encuentre enteramente sumergida durante la reacción.

E. VORTEX: Es crucial contar con una mezcla homogénea durante la etapa de SELECCIÓN y específicamente después de añadir el Reactivo 3. Todo el líquido debe encontrarse en el fondo del tubo durante las incubaciones.

F. MUESTRAS DE MEDIOS DE CULTIVO QUE CONTIENEN CELULAS: Si se encuentra presente un elevado número de células eucarióticas en la muestra (es decir, suspensiones celulares), centrifugar a 500 x durante 5 minutos. Retirar el

sobrenadante de este centrifugado a baja velocidad y utilizar 1,5 ml de ésta como muestra. Proceder desde la etapa 1 de la PREPARACION DE LAS MUESTRAS.

G. PREPARACION DEL SEDIMENTO: Cuando se preparan las muestras, retirar con una pipeta Pasteur la mayor cantidad posible de sobrenadante de las muestras centrifugadas. Se ha observado que los remanentes de medio de cultivo provocan falsos positivos bajos. Sin embargo, tener cuidado de no alterar el residuo con micoplasmas, que puede no ser visible.

H. MUESTRAS EN ZONA DE INCERTIDUMBRE:

1. El crecimiento de los cultivos con antibióticos puede reducir los niveles de micoplasmas. Se recomienda transferir las células dos veces por el medio libre de antibióticos antes de realizar el análisis. Los medios por analizar deben encontrarse en contacto con las células del cultivo celular por lo menos durante tres días.
2. Al preparar una muestra de tamaño grande se aumenta proporcionalmente la sensibilidad del test. Preparar un residuo de un volumen considerable de muestra como sigue:
   a. Obtener un tubo de centrífuga que contenga de 10 a 50 ml y que pueda ser centrifugado a gran velocidad. Marcar cuidadosamente la posición donde se formará el residuo.
   b. Añadir el medio de cultivo tomado y centrifugar entre 12.000 y 15.000 x g durante 15 minutos. Decantar cuidadosamente el sobrenandante y desecharle. El sedimento puede no ser visible y debe tenerse cuidado de no perderlo durante esta etapa.
   c. Volver a suspender el residuo en 1,5 ml de solución salina estéril o de medio de cultivo celular y proceder a la etapa 1 del procedimiento de PREPARACION DE LAS MUESTRAS.

RESULTADOS

A. INTERPRETACION DE LOS RESULTADOS

Los resultados del SISTEMA GEN-PROBE DE DETECCION RAPIDA MTC-NI se basan en valores umbral de Unidades Relativas de Luz (Relative Light Unit – RLU). Las muestras que producen una señal luminosa de valor superior o igual al valor umbral son consideradas positivas. Las señales inferiores al valor umbral son consideradas negativas. Cuando el resultado se situa en la zona de incertidumbre, el test debe repetirse. Las muestras que siguen presentando valores en dicha zona pueden corresponder a un nivel de contaminación muy bajo y deben repetirse, conforme se describe en las OBSERVACIONES.

	Positiva	Negativa
Valores umbral:	> 5.000 RLU	< 3.000 RLU
Zona de incertidumbre:	3.000 a 5.000 RLU	

B. CONTROL DE CALIDAD Y ACEPTABILIDAD DE LOS RESULTADOS

El Control Negativo y el Control Positivo deben encontrarse dentro de los rangos siguientes:

Control Negativo: < 3.000 RLU
Control Positivo: 35.000-85.000 RLU

Para verificar el calibrado y el funcionamiento de la máquina, remitirse al manual del instrumento.

LIMITES DEL METODO

Utilizar sólo para detectar contaminación bacteriana en muestras de cultivos celulares. Otras bacterias, diferentes de los micoplasmas, pueden inducir una reacción positiva si se lisan durante la preparación de la muestra.

Este test no diferencia especies bacterianas.

Un resultado negativo no excluye la posibilidad de que se encuentre presente contaminación con micoplasma a niveles inferiores a la sensibilidad del test, que es de aproximadamente de 100.000 micoplasmas por ml de medio de cultivo.

Este test detectará algunas otras especies de bacterias si son lisadas por los procedimientos de preparación de la muestra; ver VALORES ESPERADOS Y CARACTERISTICAS DE LA TECNICA. En cualquier caso, un resultado positivo indica la contaminación de la muestra de cultivo celular.

VALORES ESPERADOS Y CARACTERISTICAS DE LA TECNICA

La hibridación de la sonda con una amplia gama de especies comunmente presentes tales como *Acholeplasma, Mycoplasma, Spiroplasma* y *Ureaplasma,* han rendido señales positivas con > 10^5 organismos.

Las siguientes especies de micoplasmas se encuentran entre las analizadas con el SISTEMA GEN-PROBE DE DETECCION RAPIDA MTC-NI.

Acholeplasma laidlawii	*Mycoplasma negroni*
Mycoplasma arginini	*Mycoplasma neurolyticum*
Mycoplasma arthritidis	*Mycoplasma orale*
Mycoplasma collis	*Mycoplasma pirum*
Mycoplasma fermentans	*Mycoplasma primatum*
Mycoplasma gallisepticum	*Mycoplasma pneumoniae*
Mycoplasma genitalium	*Mycoplasma pulmonis*
Mycoplasma hominis	*Mycoplasma sualvi*
Mycoplasma hyorhinis	*Spiroplasma species*
Mycoplasma iowae	*Ureaplasma parvum*
Mycoplasma muris	*Ureaplasma urealyticum*

Los organismos Gram negativos de una amplia variedad de géneros también dieron señales positivas con la sonda bacteriana de amplio espectro contenida en este kit, cuando se prepararon siguiendo las indicaciones de la sección Preparación de la muestra. La reacción frente a organismos Gram positivos depende de la capacidad del método de preparación de la muestra para lisar los organismos. En condiciones de lisis adecuadas, todos los organismos Gram positivos de una amplia variedad de géneros también reaccionarán a este sistema de sonda. No se ha observado reacción a las dianas eucarióticas.

VALORES ESPERADOS

A. MUESTRAS:

Fueron analizadas 150 muestras utilizando el kit MTC-NI GEN-PROBE y la prueba isotópica MTC GEN-PROBE.

Los valores umbral para las muestras positivas variaron de 7.644 a 3.034.700 RLU.

Los valores umbral para las muestras negativas variaron de 490 a 2.963 RLU.

No se presentaron muestras discrepantes: todas las muestras positivas en el ensayo isotópico también fueron positivas en este ensayo no isotópico; se determinó que todas las muestras negativas eran negativas en ambos ensayos.

B. CONTROLES:

Fueron analizados 150 controles que dieron los siguientes resultados:

	Número de Observaciones	Valores RLU
Controles Negativos	81	273 a 2.484 media = 903 ± 371 DS
Controles Positivos	69	35.489 a 72.955 media = 52.092 ± 8.283 DS

Estos datos fueron dados por varios técnicos en diferentes días con lotes múltiples de reactivos, utilizando diferentes luminómetros LEADERS GEN-PROBE.

RESOLUCION DE INCIDENTES

CONTROL POSITIVO BAJO (POR DEBAJO DE 35.000 RLU)

A. Confirmar que el tubo de control positivo contenga aproximadamente 800 µl. Lecturas bajas pueden indicar que se añadieron menos de 100 µl de Control Positivo al tubo de sonda de Control Positivo.

B. Verificar que la temperatura del baño maría o bloque calefactor es de 60° ± 1°C.

C. Verificar que el tubo sonda se encuentra sumergido en el baño maría o el bloque calefactor, de modo que se cubra por completo el contenido de líquido durante la reacción. No permitir que durante el ensayo penetre agua ni soluciones no estériles en los tubos sonda.

D. Verificar el ajuste del luminómetro para confirmar un tiempo de lectura de 2 segundos.

E. Verificar la exactitud de los instrumentos de pipeteado.

CONTROL POSITIVO ELEVADO (POR SOBRE 85.000 RLU)

A. Confirmar que el tubo de control positivo contenga aproximadamente 800 µl. Lecturas elevadas pueden indicar que no se añadieron 300 µl del Reactivo de Selección.

B. Verificar que la temperatura del baño maría o bloque calefactor es de 60° ± 1°C y que el ajuste del luminómetro es correcto.

C. Verificar que los tubos son incubados durante 10 minutos durante la etapa de Selección.

CONTROL NEGATIVO ELEVADO (POR SOBRE 3000 RLU)

A. Confirmar que el tubo de control negativo contiene aproximadamente 800 µl. Lecturas elevadas pueden indicar que no se añadieron 300 µl del Reactivo de Selección.

B. Verificar que la temperatura del baño maría o del bloque calefactor es de 60° ± 1°C y que el ajuste del luminómetro es correcto.

C. Verificar que los tubos sean incubados durante 10 minutos durante la etapa de Selección.

D. NO intercambiar los tapones de los controles positivo y negativo.

E. Eliminar la electricidad estática limpiando los tubos con un paño húmedo o una toalla de papel antes de colocarlos en el luminómetro.

MUESTRAS EN LA ZONA DE INCERTIDUMBRE (3000-5000 RLU)

A. Verificar que la temperatura de las incubaciones es de 60° ± 1°C. Debe utilizarse un termómetro exacto.

B. Verificar que la muestra es homogénea y que no quedan gotas sobre la superficie del líquido durante ninguna incubación.

C. Los cultivos pueden estar contaminados con un nivel muy bajo de bacterias. Aumentar la sensibilidad del test, tal como se describe en las OBSERVACIONES - H. Puede ser necesario que las células pasen por lo menos dos veces después de sacarlas de la congelación antes de que haya suficientes bacterias para la detección.

D. Los medios de cultivo no pueden ser congelados antes del centrifugado, etapa 2 de la PREPARACION DE LAS MUESTRAS.

LECTURAS VARIABLES

A. Verificar la exactitud de los instrumentos de pipeteo.

B. Eliminar la carga estática y cualquier residuo limpiando los tubos con un paño húmedo o toalla de papel inmediatamente antes de colocarlos en el luminómetro.

C. Verificar que todo el residuo de muestra se encuentra homogéneamente resuspendido y que es transferido en su totalidad al tubo sonda.

D. Verificar el funcionamiento de las bombas del luminómetro, como se indica en el manual del instrumento. Verificar el calibrado del instrumento.

E. La contaminación de los tubos con Rnasa o bacterias puede afectar los resultados del test. Utilizar técnicas asépticas cuando se manipulan todos los tubos y reactivos.

MYCOPLASMA IN COLTURE CELLULARI (MTC-NI)
SISTEMA PER L' IDENTIFICAZIONE RAPIDA

(bioMerieux cod. 39503 / Gen-Probe Cat. N. 104573)

IMPIEGO

Il SISTEMA GEN-PROBE PER L' IDENTIFICAZIONE RAPIDA DEI MICOPLASMI NELLE COLTURE CELLULARI (MTC-NI) é un prodotto che permette la rilevazione della presenza di contaminazione da micoplasmi nelle colture cellulari.

Riservato esclusivamente ad un impiego di laboratorio.

INTRODUZIONE

Le specie del genere *Mycoplasma* costituiscono una fonte importante di contaminazione delle colture cellulari. I micoplasmi che si sviluppano sulle colture cellulari possono raggiungere concentrazioni di 10^8 CFU (colony forming units) per millimetro di supernatante. Inoltre, i micoplasmi possono fissarsi sulle membrane cellulari (1, 4).

I micoplasmi che sono sprovvisti di parete cellulare non modificano la torbidità delle colture cellulari e di conseguenza non possono essere rilevati visivamente. Questi microrganismi sono resistenti agli antibiotici che agiscono sulla parete cellulare e questo rende difficile l'eradicazione della contaminazione.

Le conseguenze della contaminazione delle colture da parte dei micoplasmi sono state descritte da Barile e dal suo team (2) e da McGarrity e Kotani (6). É stato dimostrato che dopo passaggio poteva risultare infettato fino al 15% delle linee cellulari. Di conseguenza, si raccomanda di testare tutte le linee cellulari una volta al mese allo scopo di verificare la disseminazione dell'infezione (3, 6, 9).

I micoplasmi, quando sono presenti in una coltura, rappresentano una fonte di interferenza per lo svolgimento dello studio dei parametri cellulari. Possono far apparire anomalie cromosomiche e provocare variazioni antigeniche sulle membrane cellulari. Sono anche in grado di compromettere il metabolismo cellulare poiché usano le sostanze nutritive destinate alle cellule. Infine, possono avere una rilevante influenza sui meccanismi di fusione cellulare (8).

É stato dimostrato che il 98% delle contaminazioni nei laboratori era dovuto a sei specie appartenenti ai generi *Mycoplasma* e *Acholeplasma* (5). Queste specie sono le seguenti:

Acholeplasma laidlawii	*Mycoplasma hyorhinis*
Mycoplasma orale	*Mycoplasma salivarium*
Mycoplasma arginini	*Mycoplasma hominis*

Il *Mycoplasma hyorhinis* é all'origine del 30 - 40% delle infezioni in determinati laboratori.

Le metodiche abitualmente impiegate per l'identificazione dei micoplasmi si basano sulla coltura e la rilevazione biochimica. La coltura dei micoplasmi può richiedere fino a tre settimane. É un'operazione complessa perché deve essere condotta su un medium specifico e in atmosfera microaerofila. Inoltre, determinate specie non possono essere coltivate secondo le metodiche di routine.

Il SISTEMA GEN-PROBE MTC-NI PER L' IDENTIFICAZIONE RAPIDA impiega il principio dell'ibridazione degli acidi nucleici e dell'RNA ribosomiale (rRNA) per la rilevazione dei micoplasmi nelle colture cellulari (10). I campioni positivi possono essere identificati nell'arco di 75 minuti. Il kit MTC-NI GEN-PROBE contiene una sonda batterica che consente di rilevare tutte le specie di *Mycoplasma* e di *Acholeplasma* in grado di contaminare le colture cellulari così come tutte le specie batteriche che possano essere presenti.

PRINCIPIO OPERATIVO

I test di ibridazione degli acidi nucleici sfruttano la capacità dei filamenti complementari di acidi nucleici di accoppiarsi in maniera specifica per formare composti stabili a doppia catena. Il SISTEMA GEN-PROBE MTC-NI PER L' IDENTIFICAZIONE RAPIDA impiega una sonda a DNA a catena singola - associata ad un marker chemioluminescente - complementare all'rRNA dell'organismo bersaglio. Una volta liberato l'rRNA dell'organismo bersaglio, la sonda si combina con le sue sequenze omologhe formando un complesso DNA-RNA stabile. Le sonde ibridate vengono separate dalle sonde non ibridate. Il Reagente di Selezione permette di differenziare le sonde ibridate da quelle non ibridate. Il Luminometro GEN-PROBE (7) permette di misurare gli ibridi DNA-RNA. Il risultato sarà positivo se il luminometro indicherà un valore superiore o uguale al valore soglia, negativo se mostrerà un valore inferiore.

REAGENTI

I reagenti impiegati nel SISTEMA GEN-PROBE MTC-NI PER L' IDENTIFICAZIONE RAPIDA sono forniti in due diversi kit:

MTC-NI KIT GEN-PROBE (bioMérieux cod. 39503 / Gen-Probe Cat. N. 104573)	**50 Test**
Reagente 1 (Reagente Sonda) (P)	5 x 10 provette
Controllo positivo (PC)	1 x 2,5 ml soluzione tamponata di RNA
Reagente 2 (Reagente di Ibridazione) (H)	1 x 15 ml soluzione tamponata
Reagente 3 (Reagente di Selezione) (S)	1 x 20 ml soluzione tamponata

KIT DI REAGENTI DI IDENTIFICAZIONE GEN-PROBE (bioMérieux cod. 39300 / Gen-Probe Cat. N. 201791)	
Reagente di Rivelazione I (RI) 0,1% di perossido di idrogeno in acido nitrico 0,001 N	1 x 240 ml
Reagente di Rivelazione II (RII) Idrossido di sodio 1 N.	1 x 240 ml

MATERIALI RICHIESTI MA DISPONIBILI SEPARATAMENTE

Bagnomaria o incubatore (60° ± 1°C)
Micropipette (100 µl, 300 µl)
Micropipette a volume fisso (300 µl)
Vortex
Microcentrifuga (12.000-15.000 x g)
Provette per microcentrifuga (2 ml)

ULTERIORE MATERIALE DISPONIBILE PRESSO IL VOSTRO DISTRIBUTORE GEN-PROBE

Luminometro GEN-PROBE (LEADER 50i)
(bioMérieux cod. 39400 / Gen-Probe Cat. N. 103100i)

Kit di Reagenti di Rivelazione GEN-PROBE
(bioMérieux cod. 39300 / Gen-Probe Cat. N. 201791)

Incubatore GEN-PROBE (60° ± 1°C)
(bioMérieux cod. 39406 / Gen-Probe Cat. N. 302902 o 302903)

PRECAUZIONI D'USO

A. Il test é riservato esclusivamente ad un uso di laboratorio. Non impiegare a fini diagnostici.

B. Durante la realizzazione di questo test adottare le normali precauzioni.

C. Da usarsi esclusivamente per l'identificazione della contaminazione da micoplasmi delle colture cellulari.

D. Impiegare unicamente il materiale compreso nel kit o materiale monouso di laboratorio.

E. Evitare qualsiasi contatto della cute e delle mucose con i Reagenti di Rivelazione I e II. In caso di contatto, sciacquare accuratamente con acqua le parti interessate. Se si verificassero versamenti di reagenti, diluirli con acqua prima di asciugare la superficie.

CONSERVAZIONE

Le Provette di Reagente Sonda devono essere conservate nelle confezioni di alluminio a temperature comprese fra 2° e 8°C. Prima dell'apertura rimangono stabili fino alla data di scadenza. Dopo l'apertura, la confezione deve essere richiusa ermeticamente e le provette devono essere usate nell'arco di due mesi entro e non oltre la data di scadenza.

Il controllo positivo deve essere conservato a una temperatura compresa tra 2° e 8°C. Riscaldarlo e agitarlo leggermente a 60° per due minuti prima dell'uso.

Gli altri reagenti del kit MTC-NI possono essere conservati ad una temperatura compresa tra 2° e 25°C e rimangono stabili fino alla data di scadenza.

Le etichette dei reagenti MTC-NI contengono i seguenti simboli ai fini della conservazione:

Data di scadenza Numero lotto a

Limiti di temperatura

I simboli fanno riferimento alla norma europea alle raccomandazioni.

NON CONGELARE I REAGENTI.

PREPARAZIONE DEL CAMPIONE

Il SISTEMA GEN-PROBE PER L' IDENTIFICAZIONE RAPIDA DEI MICOPLASMI (MTC-NI) é stato progettato per rilevare la contaminazione da micoplasmi dei tessuti cellulari. É possibile anche testare le sospensioni cellulari. Il test può essere condotto su colture realizzate in terreni che contengono antibiotici, ma la concentrazione dei micoplasmi sarà più debole. Prima di effettuare il test, si consiglia di ripassare due volte le cellule in due terreni di coltura che non contengano antibiotici. I terreni testati devono essere stati a contatto con le cellule almeno per tre giorni. Fare riferimento al paragrafo OSSERVAZIONI per l'analisi dei campioni che non rispondono a questi criteri. Qualora fosse necessario, i campioni possono essere conservati per 7 giorni a 4°C prima di essere sottoposti al test. Per una maggiore sensibilità dei campioni, la loro preparazione deve avvenire a meno di 4 ore dal prelievo. In caso di impossibilità, i terreni possono essere conservati a una temperatura di 2° - 8°C per un massimo di tre giorni. I campioni possono essere archiviati o conservati per ulteriori test procedendo alla fase 3 della PREPARAZIONE DEL CAMPIONE. Il tampone di ibridazione deve essere aggiunto al sedimento del campione conservato a -20°C o al di sotto, per la durata di un mese.

NOTA: I campioni torbidi sono probabilmente contaminati da lieviti o da un altro tipo di batteri e devono essere eliminati.

PROCEDIMENTO

A. PREPARAZIONE DELL'APPARECCHIATURA

1. Impostare un incubatore o un sistema a bagnomaria a 60° ± 1°C.
2. Preparare il Luminometro GEN-PROBE. Assicurarsi che la quantità di Reagenti di Rivelazione I e II sia sufficiente per condurre i test.

B. PREPARAZIONE DEL CAMPIONE

1. Trasferire tramite pipetta 1,5 ml di coltura cellulare in una provetta per microcentrifuga. Identificare ed evidenziare, mediante un segno, la provetta in cui verrà realizzato il sedimento. Per i campioni che contengono oltre 1 milione di cellule eucariotiche, fare riferimento al paragrafo OSSERVAZIONI.
2. Centrifugare a 12.000 - 15.000 x g per 10 minuti. Togliere ed eliminare il supernatante tramite una pipetta Pasteur. Il sedimento potrebbe non essere visibile e di conseguenza occorre prendere tutte le precauzioni necessarie per evitarne la perdita durante l'eliminazione del supernatante.
3. Aggiungere 100 µl di Reagenti di Ibridazione nella provetta di microcentrifugazione. Vortexare con forza la miscela. (Questi campioni possono essere conservati a una temperatura di -20°C o al di sotto per un mese. I campioni congelati devono essere riscaldati a 60° ± 1°C per 2 minuti. Prima dell'impiego, mescolare con un Vortex al fine di ottenere una soluzione omogenea.)

C. IBRIDAZIONE

1. Tagliare orizzontalmente la parte superiore delle confezioni di alluminio. Prelevare il numero necessario di provette di Reagente Sonda per testare i campioni e/o le colture di controllo. Richiudere ermeticamente la confezione ripiegando più volte l'estremità e fermandola con nastro adesivo o con una clip. Non asportare dalla confezione di agenti essiccanti e conservarla chiusa a una temperatura di 2° - 8°C.
2. Predisporre un numero sufficiente di provette di Reagente Sonda per testare i campioni e le colture di controllo. Rimuovere e conservare i tappi.
3. Dispensare 100 µl di Reagente di Ibridazione sul fondo delle provette di Controllo Negativo.
4. Dispensare 100 µl di Controllo Positivo sul fondo delle provette di Controllo Positivo.
5. Dispensare 100 µl di ogni campione sul fondo delle rispettive provette campione.
6. Richiudere tutte le provette e vortexare a velocità moderata la miscela per una durata di 1 - 3 secondi. Durante l'incubazione, tutti i campioni devono essere sul fondo delle provette.
7. Mettere in incubazione per 45 minuti a 60° ± 1°C a bagnomaria o in incubatore.

D. SELEZIONE

1. Prelevare le provette di Reagente Sonda dal bagnomaria o dall'incubatore. Rimuovere e conservare i tappi. Dispensare immediatamente 300 µl di Reagente 3 (Reagente di Selezione) in ogni provetta. Richiudere le provette e vortexare la miscela per una durata da 1 a 3 secondi. Durante l'incubazione, tutti i campioni dovranno essere sul fondo delle provette.
2. Mettere le provette di Reagente Sonda in incubazione per 10 minuti a 60° ± 1°C a bagnomaria o in incubatore.
3. Rimuovere le provette di Reagente Sonda dal bagnomaria o dall'incubatore e mantenerle a temperatura ambiente almeno per 5 minuti. Togliere e buttare via i tappi. Avvalendosi di un Luminometro GEN-PROBE leggere i risultati del test nell'ora successiva.

E. LETTURA

1. Selezionare il protocollo giusto sul Luminometro GEN-PROBE.
2. Per eliminare completamente i residui dalla superficie delle provette, asciugare utilizzando un foglio assorbente inumidito. Inserire successivamente le provette nel Luminometro GEN-PROBE e seguire attentamente le istruzioni contenute nel manuale d'uso.
3. Una volta conclusa l'analisi, estrarre le provette dal luminometro.

OSSERVAZIONI

A. REAGENTE: il Reagente 2 (Reagente di Ibridazione) può precipitare. Riscaldare e mescolare a 60°C ± 1°C per 2 minuti per sciogliere il precipitato.

B. TEMPERATURA: L'Ibridazione e la Selezione sono reazioni temperatura-dipendenti. Di conseguenza, é indispensabile mantenere il bagnomaria o l'incubatore alla temperatura raccomandata per l'intera durata del test.

C. DURATA DELLE OPERAZIONI: Le reazioni di Ibridazione e Selezione dipendono dal tempo. L'ibridazione deve durare come minimo 45 minuti e come massimo 60 minuti. Durante la SELEZIONE, mettere le provette di Reagente Sonda in incubazione almeno per 10 minuti senza superare però il limite dei 12 minuti.

D. BAGNOMARIA: Il livello d'acqua deve essere sufficientemente alto per far sì che la totalità del liquido di reazione delle provette di Reagente Sonda sia completamente sommerso.

E. USO DEL VORTEX: É fondamentale disporre di una miscela omogenea durante la SELEZIONE, in modo particolare dopo l'aggiunta del Reagente 3. Tutte le miscele devono trovarsi sul fondo della provetta durante le fasi di messa in incubazione.

F. CAMPIONI DI TERRENI CONTENENTI DELLE CELLULE: se un elevato numero di cellule eucariotiche é presente nel campione (vale a dire delle sospensioni cellulari) centrifugare a 500 x g per 5 minuti. Prelevare il supernatante e trasportare 1,5 ml dello stesso come campione. Riprendere la fase 1 della PREPARAZIONE DEL CAMPIONE.

G. PREPARAZIONE DEL SEDIMENTO: Durante la preparazione dei campioni, prelevare il più possibile di supernatante dai campioni centrifugati avvalendosi di una pipetta Pasteur. É stato dimostrato che i residui di terreni causano falso-positivi bassi. Non dimeno, aver cura di non alterare il sedimento di micoplasmi che potrebbe non essere visibile.

H. CAMPIONI NELL'AREA DI INCERTEZZA

1. La crescita delle colture in presenza di antibiotici può diminuire la concentrazione dei micoplasmi. Prima di effettuare il test, si consiglia di ripassare due volte le cellule in due terreni di coltura che non contengano antibiotici. I terreni testati devono essere stati a contatto con le cellule per almeno tre giorni.
2. La preparazione di un grande campione favorisce la sensibilità del test. Per preparare un sedimento per un grande campione procedere nel modo seguente:
   a. Prendere una provetta da centrifugare che possa contenere da 10 a 50 ml e che sia in grado di sopportare una centrifugazione a grande velocità. Segnare con cura la posizione di formazione del sedimento.
   b. Aggiungere i terreni prelevati e centrifugare da 12.000 a 15.000 x g per 15 minuti. Decantare con la massima cura il supernatante ed eliminarlo. Il sedimento potrebbe non essere visibile e di conseguenza occorre adottare tutte le precauzioni necessarie durante questa fase per preservarlo.
   c. Rimettere il sedimento in sospensione in 1,5 ml di siero fisiologico sterile o di medium cellulare. Procedere alla fase 1 della PREPARAZIONE DEL CAMPIONE.

RISULTATI DEL TEST

A. INTERPRETAZIONE DEI RISULTATI

I risultati del SISTEMA GEN-PROBE MTC-NI PER L' IDENTIFICAZIONE RAPIDA vengono interpretati in base a valori soglia RLU (Relative Light Units). I campioni che originano un segnale luminoso di valore superiore o uguale a questa soglia vengono considerati positivi. I segnali luminosi inferiori a questa soglia sono considerati negativi. Quando il risultato si posiziona nell'area di incertezza, il test deve essere ripetuto. Se la seconda analisi evidenzia ancora risultati equivoci che inducono una debole contaminazione, occorre testare di nuovo come descritto nel paragrafo OSSERVAZIONI.

	Positivo	Negativo
Valore soglia:	> 5.000 RLU	< 3.000RLU
Area di incertezza:	da 3.000 a 5.000 RLU	

B. CONTROLLO DI QUALITÀ ED ACCETTABILITÀ DEI RISULTATI

I controlli negativi e positivi devono soddisfare i seguenti valori:

Controllo negativo: < 3.000 RLU
Controllo positivo: 35.000 - 85.000 RLU

Per verificare la taratura della macchina ed il suo funzionamento attenersi alle istruzioni contenute nel manuale strumentazioni.

LIMITI DEL TEST

Riservato esclusivamente all'identificazione di una contaminazione batterica nei campioni di colture cellulari. Batteri, diversi dai micoplasmi, possono indurre una reazione positiva se vengono lisati durante la preparazione del campione.

Questo test non consente di differenziare le specie batteriche.

Un risultato negativo non può escludere la possibilità di una contaminazione da micoplasmi con una concentrazione inferiore al tasso di sensibilità che é di circa 100.000 micoplasmi per ml di terreni di coltura.

Questo test identificherà talune altre specie batteriche se vengono lisate durante la preparazione del campione; fare riferimento al paragrafo PERFORMANCE DEL TEST. In ogni caso, un risultato positivo indicherà una contaminazione del campione di coltura cellulare.

PERFORMANCE DEL TEST

L'ibridazione della sonda con un amplio ventaglio di specie comunemente rilevate di *Acholeplasma, Mycoplasma, Spiroplasma,* e *Ureaplasma* hanno fornito segnali positivi in > 10^5 organismi.

Le seguenti specie di micoplasmi sono fra quelle testate con il SISTEMA GEN-PROBE MTC-NI PER L' IDENTIFICAZIONE RAPIDA.

Acholeplasma laidlawii	*Mycoplasma negroni*
Mycoplasma arginini	*Mycoplasma neurolyticum*
Mycoplasma arthritidis	*Mycoplasma orale*
Mycoplasma collis	*Mycoplasma pirum*
Mycoplasma fermentans	*Mycoplasma primatum*
Mycoplasma gallisepticum	*Mycoplasma pneumoniae*
Mycoplasma genitalium	*Mycoplasma pulmonis*
Mycoplasma hominis	*Mycoplasma sualvi*
Mycoplasma hyorhinis	*Spiroplasma species*
Mycoplasma iowae	*Ureaplasma parvum*
Mycoplasma muris	*Ureaplasma urealyticum*

Gli organismi Gram negativi, provenienti da una grande varietà di taxa, producono anche segnali positivi con la sonda batterica ad ampio spettro usata in questo kit durante la preparazione come descritto nel paragrafo Preparazione del Campione. La reazione con microrganismi Gram positivi dipende dalla capacità di lisi dei batteri durante la preparazione del campione. Avvalendosi di adeguate condizioni di lisi, qualsiasi organismo Gram positivo di una grande varietà di taxa é in grado di reagire con questo sistema sonda. Non é stata rilevata alcuna reazione con cellule eucariotiche bersaglio.

VALORI ATTESI

A. CAMPIONI:

Sono stati analizzati centocinquanta campioni con il sistema il kit GEN-PROBE MTC-NI ed il test isotopico GEN-PROBE MTC.

I valori soglia per i campioni positivi variano da 7.644 a 3.034.700 RLU.

I valori soglia per i campioni negativi variano da 490 a 2.963 RLU.

Non vi é campione discordante; tutti i campioni positivi al test isotopico lo sono anche nel test non isotopico. Tutti i campioni negativi sono risultati negativi nell'insieme dei test.

B. CONTROLLI:

Sono stati testati centocinquanta controlli e i risultati sono i seguenti:

	Numero di Osservazioni	Valori soglia RLU
Controlli negativi	81	da 273 a 2.484 media = 903 ± 371 SD
Controlli positivi	69	da 35.489 a 72.955 media = 52.092 ± 8.283 SD

Questi dati sono stati forniti da più tecnici in giorni diversi con lotti di reagenti differenti che impiegano LEADERS GEN-PROBE diversi.

SOLUZIONE DI EVENTUALI PROBLEMI

BASSO CONTROLLO POSITIVO (< 35.000 RLU)

A. Controllare che la provetta di controllo positivo contenga circa 800 µl. Bassi valori di lettura possono indicare che meno di 100 µl di Controllo positivo siano stati aggiunti nella provetta Sonda Controllo Positivo.

B. Verificare che la temperatura del bagnomaria o dell'incubatore sia di 60° ± 1°C.

C. Assicurarsi che la provetta di Reagente Sonda sia immersa nel bagnomaria o nell'incubatore per far sì che il liquido di reazione sia completamente sommerso. Durante il test, evitare che l'acqua o la soluzione non sterile penetri nelle provette sonda.

D. Impostare il luminometro per una durata di lettura di 2 secondi.

E. Verificare il materiale di pipettaggio.

ALTO CONTROLLO POSITIVO (> 85.000 RLU)

A. Controllare che la provetta di controllo positivo contenga circa 800 µl. Alti valori di lettura possono indicare che non sono stati aggiunti 300 µl di reagente di selezione.

B. Verificare che la temperatura del bagnomaria o dell'incubatore sia di 60° ± 1°C e che il luminometro funzioni correttamente.

C. Assicurarsi che le provette vengano messe in incubazione per 10 minuti durante la fase di Selezione.

ALTO CONTROLLO NEGATIVO (> 3000 RLU)

A. Verificare che la provetta di controllo negativo contenga circa 800 µl. Alti valori di lettura possono indicare che non sono stati aggiunti 300 µl di reagente di selezione.

B. Verificare che la temperatura del bagnomaria o dell'incubatore sia di 60° ± 1°C e che il luminometro funzioni correttamente.

C. Assicurarsi che le provette vengano messe in incubazione per 10 minuti durante la fase di SELEZIONE.

D. NON scambiare i tappi dei controlli negativi e positivi.

E. Eliminare le cariche statiche asciugando i flaconi con carta assorbente o un panno umido prima di inserirli nel luminometro.

CAMPIONI NELL'AREA DI INCERTEZZA (3.000 - 5.000 RLU)

A. Verificare che la temperatura delle incubazioni sia di 60° ± 1°C. É necessario impiegare un termometro.

B. Verificare che il campione sia omogeneo ed assicurarsi che durante le messe in incubazione nessuna goccia risalga alla superficie del liquido.

C. Le colture possono essere state contaminate con una concentrazione molto bassa di batteri. Aumentare la sensibilità del test come descritto nel paragrafo OSSERVAZIONI - H. Alcune cellule hanno forse bisogno di subire due sottocolture dopo averle prelevate dalla fase di congelazione allo scopo di avere una quantità sufficiente di batteri per la rilevazione.

D. I terreni di coltura non possono essere congelati prima della centrifugazione, fase 2 del paragrafo PREPARAZIONE DEL CAMPIONE.

LETTURE VARIABILI

A. Verificare il funzionamento degli strumenti di pipettaggio.

B. Asciugare i flaconi con carta assorbente o un panno umido prima di inserirli nel luminometro al fine d eliminare le cariche statiche.

C. Assicurarsi che la totalità del sedimento del campione sia nuovamente in sospensione in modo omogeneo e che sia stato trasportato nella provetta sonda.

D. Verificare il funzionamento delle pompe del luminometro attenendosi a quanto indicato nel manuale d'uso della strumentazione. Verificare la taratura dello strumento.

E. La contaminazione delle provette o dei reagenti con RNasi o batteri può compromettere i risultati del test. Impiegare la tecnica asettica durante la manipolazione delle provette e dei reagenti.

MICOPLASMA TECIDO CULTURA NI (MTC-NI)
SISTEMA DE DETECÇÃO RÁPIDA

(bioMérieux Ref. 39503 / Gen-Probe Cat No. 104573)

UTILIZAÇÃO

O SISTEMA GEN-PROBE DE DETECÇÃO RÁPIDA DE MICOPLASMAS NAS CULTURAS CELULARES (MTC-NI) é um produto que permite detectar a presença de contaminação pelos micoplasmas em culturas celulares.

Para uso em laboratório.

INTRODUÇÃO

As espécies do género *Mycoplasma* constituem uma importante fonte de contaminação das culturas celulares. Os micoplasmas que se desenvolvem em culturas celulares podem atingir concentrações de 10^8 UFC (Unidade Formadora Colónia) por millilitro de sobrenadante. Além disto, os micoplasmas podem fixar-se nas membranas celulares (1, 4).

Os micoplasmas, que não têm membrana celular, não modificam a turbidez das culturas celulares não podendo ser detectados visualmente. Estes microrganismos são resistentes aos antibióticos que agem sobre a membrana celular, o que torna difícil a irradicação da contaminação.

As consequências da contaminação das culturas pelos micoplasmas foram descritas por Barile e a sua equipa (2) e por McGarrity e Kotani (6). Foi demonstrado que podia haver até 15% de linhas celulares infectadas após passagens. É, em consequência, recomendado testar todas as linhas celulares uma vez por mês, para verificar a disseminação da infecção (3, 6, 9).

Quando os micoplasmas estão presentes numa cultura, os micoplasmas são uma fonte de interferências para o estudo dos parâmetros celulares. Podem provocar o aparecimento de anomalias cromossómicas e de variações antigénicas sobre as membranas celulares. Podem também afectar o metabolismo celular porque utilizam as substâncias nutritivas destinadas às células. Por fim, podem ter uma influência sobre mecanismos de fusão celular (8).

Mostrou-se que 98% das contaminações nos laboratórios eram devidas a seis espécies pertencendo aos géneros *Mycoplasma* e *Acholeplasma* (5). Estas espécies são:

Acholeplasma laidlawii	*Mycoplasma hyorhinis*
Mycoplasma orale	*Mycoplasma Salivarium*
Mycoplasma arginini	*Mycoplasma hominis*

O *Mycoplasma hyorhinis* está na origem de 30 a 40% das infecções em certos laboratórios.

Os primeiros métodos utilizados para a detecção dos micoplasmas baseavam-se na cultura e na identificação bioquímica. A cultura dos micoplasmas pode levar até três semanas. Ela é difícil porque deve ser realizada em meio específico e em atmosfera micro-aerófila. Além disso, algumas espécies não podem ser cultivadas segundo métodos de rotina.

O SISTEMA GEN-PROBE MTC-NI DE DETECÇÃO RÁPIDA utiliza o princípio de hibridização dos ácidos nucléicos e detecção do ARN ribossómico (ARNr) para a detecção dos micoplasmas em culturas celulares(10). As amostras positivas podem ser detectadas em 75 minutos. O dispositivo MTC-NI GEN-PROBE contém uma sonda bacteriana que permite detectar todas as espécies de *Mycoplasma* e de *Acholeplasma* susceptíveis de contaminar as culturas celulares, assim como todas as espécies bacterianas que podem estar presentes.

PRINCÍPIO

Os testes por hibridização de ácidos nucléicos são baseados na capacidade de cadeias complementares de ácidos nucléicos emparelharem de forma específica para formar complexos bicatenários estáveis. O SISTEMA GEN-PROBE MTC-NI DE DETECÇÃO RÁPIDA utiliza uma sonda ADN monocatenária, complementar do ARNr do organismo-alvo. Quando o ARNr do organismo-alvo é libertado, a sonda hibridiza com este para formar um complexo ADN:ARN estável. As sondas hibridizadas são então separadas das sondas não hibridizadas. O Reagente de Selecção permite diferenciar as sondas hibridizadas das não-hibridizadas. Os híbridos ARN:ADN marcados são medidos com o Luminómetro GEN-PROBE (7). Um resultado positivo corresponde a uma leitura do luminómetro dando um valor igual ou superior ao valor limiar. Um valor abaixo do limiar dá um resultado negativo.

REAGENTES

Os reagentes utilizados para o SISTEMA GEN-PROBE MTC-NI DE DETECÇÃO RÁPIDA são fornecidos em duas embalagens distintas:

Embalagem MTC-NI GEN-PROBE (bioMérieux Ref. 39503 / Gen-Probe Cat No. 104573)	**50 Testes**
Reagente 1 (Reagente Sonda) (P)	5 x 10 tubos
Controlo positivo (PC)	1x 2,5 ml solução de ARN tampão
Reagente 2 (Reagente de Hibridização) (H)	1 x 15 ml solução tampão
Reagente 3 (Reagente de Selecção) (S)	1 x 20 ml solução tampão

REAGENTES DE DETECÇÃO GEN-PROBE (bioMérieux Ref. 39300 / Gen-Probe Cat No. 201791)	
Reagente de detecção I (RI) 0,1% de peroxido de hidrogénio em ácido nítrico 0,001 N	1 x 240 ml
Reagente de detecção II (RII) Hidróxido de sódio 1 N.	1 x 240 ml

MATERIAL NECESSÁRIO MAS NÃO FORNECIDO

Banho-maria ou bloco de aquecimento (60° ± 1°C)
Micropipetas (100 µl, 300 µl)
Pipetas repetitivas (300 µl)
Vortex
Microcentrífuga (12.000-15.000 x g)
Tubos para microcentrífuga (2 ml)

DISPONÍVEL NOS DISTRIBUIDORES GEN-PROBE

GEN-PROBE Luminómetro (LEADER 50i)
(bioMérieux Ref. 39400 / Gen-Probe Cat. No. 103100i)

GEN-PROBE Reagentes de Detecção
(bioMérieux Ref. 39300 / Gen-Probe Cat. No. 201791)

GEN-PROBE Bloco de aquecimento (60° ± 1°C)
(bioMérieux Ref. 39406 / Gen-Probe Cat. No. 302902 ou 302903)

PRECAUÇÕES DE UTILIZAÇÃO

A. Utilização reservada aos laboratórios. Não utilizar para o diagnóstico.

B. Seguir as precauções de utilização durante a realização deste teste.

C. Utilizar para a detecção de contaminação por micoplasmas em culturas celulares.

D. Utilizar unicamente o material fornecido ou material do laboratório específico.

E. Evitar o contacto dos Reagentes de Detecção I e II com a pele, os olhos e as mucosas. No caso de contacto, lavar com água. Se estes reagentes forem derramados, diluí-los com água antes de limpar.

CONSERVAÇÃO

Os Tubos de Reagente Sonda devem ser conservados nas saquetas/sachets de alumínio 2° - 8°C. São estáveis antes de abertura até à data de validade. Após abertura, a saqueta/sachet deve ser bem fechada e conservada a 2° - 8°C e os tubos devem ser utilizados num prazo de um mês após abertura e antes da data de validade.

O controlo positivo deve ser conservado a 2° - 8°C e aquecido, mexendo devagar, a 60°C durante 2 minutos antes da utilização.

Os outros reagentes do dispositivo MTC-NI podem ser conservados entre 2° - 25°C e são estáveis até à data de validade.

As etiquetas do reagente MTC-NI possuem os símbolos seguintes para a sua conservação:

Data de validade Número de lote

Limites de temperatura

Os símbolos referem-se à norma europeia às recomendações.

NÃO CONGELAR OS REAGENTES.

PREPARAÇÃO DA AMOSTRA

O SISTEMA GEN-PROBE DE DETECÇÃO RÁPIDA DE MICOPLASMAS (MTC-NI) é concebido para detectar a contaminação por micoplasmas em tecidos celulares. As suspensões celulares podem igualmente ser testadas. O teste pode ser praticado com culturas realizadas em meios contendo antibióticos, mas a concentração de micoplasmas será mais fraca. É recomendado transferir as células sucessivamente para dois meios sem antibióticos antes de as testar. Os meios testados devem ter estado em contacto com as células durante pelo menos três dias. Consultar o parágrafo NOTAS para a análise de amostras não respondendo a estes critérios. Se necessário, as amostras podem ser conservadas 7 dias a 4°C antes de ser feito o teste. Para uma maior sensibilidade, as amostras devem ser preparadas até 4 horas após a colheita/coleta. Em caso de impossibilidade, os meios podem ser conservados a 2° - 8°C durante um máximo de 3 dias. As amostras podem ser guardadas ou conservadas para ensaios posteriores procedendo até a etapa 3 da PREPARAÇÃO DA AMOSTRA. O tampão de hibridização deverá juntar-se ao sedimento e a amostra conservada a -20°C ou abaixo, durante um mês.

NOTA: As amostras turvas estão provavelmente contaminadas com leveduras ou outro tipo de bactérias e devem ser eliminadas.

PROCEDIMENTO

A. PREPARAÇÃO DO MATERIAL

1. Regular a temperatura do bloco de aquecimento ou do banho-maria a 60° ± 1°C.
2. Preparar o Luminómetro GEN-PROBE. Assegurar-se que os volumes dos reagentes de Detecção I e II são suficientes para efectuar os testes.

B. PREPARAÇÃO DA AMOSTRA

1. Pipetar 1,5 ml de cultura celular para um de microcentrífuga. Identificar e marcar o lado do tubo no qual se formará o sedimento. Para as amostras contendo mais de 1 milhão de células eucariotas, consultar o parágrafo NOTAS.
2. Centrifugar a 12.000 - 15.000 x g durante 10 minutos. Eliminar o sobrenadante com uma pipeta Pasteur. O sedimento pode não ser visível e por isso devem ser tomadas precauções para evitar a sua perda durante a eliminação do sobrenadante.
3. Acrescentar 100 µl de Reagente de Hibridização no tubo de microcentrífuga. Agitar vigorosamente a mistura em Vortex. (Estas amostras podem ser conservadas a -20°C ou abaixo durante um mês. As amostras congeladas devem ser aquecidas a 60° ± 1°C durante 2 minutos. Antes de serem utilizadas, agitar em Vortex para obter uma solução homogénea.)

C. HIBRIDIZAÇÃO

1. Cortar horizontalmente a parte superior da saqueta/sachet de alumínio. Retirar o número necessário de tubos de Reagentes Sonda para testar as amostras e/ou as estirpes/cepas de controlo. Fechar bem a saqueta/sachet dobrando várias vezes a sua extremidade e fixando-a com fita-cola ou com um clip. Não retirar a saqueta/sachet que contém o dissecante e conservar o saco fechado a 2° - 8°C.
2. Etiquetar um número suficiente de tubos de Reagente Sonda para testar as amostras e as estirpes/cepas de controlo. Tirar e conservar as tampas.
3. Pipetar 100 µl de Reagente de Hibridização para tubos de Controlo Negativo.
4. Pipetar 100 µl de Controlo Positivo para tubos de Controlo Positivo.
5. Pipetar 100 µl de cada amostra para tubos de amostra apropriados.
6. Tapar todos os tubos e agitar, a velocidade moderada, a mistura em Vortex durante 1 a 3 segundos. Durante a incubação, todas as amostras deverão estar no fundo dos tubos.
7. Incubar durante 45 minutos a 60° ± 1°C em banho-maria ou no bloco de aquecimento.

D. SELECÇÃO

1. Retirar os tubos de Reagente Sonda do banho-maria ou do bloco de aquecimento. Retirar e conservar as tampas. Distribuir imediatamente 300 µl de Reagente 3 (Reagente de Selecção) em cada tubo. Voltar a fechar os tubos e agitar em Vortex durante 1 a 3 segundos. Durante a incubação, todas as amostras devem estar no fundo dos tubos.
2. Incubar os tubos de Reagente Sonda durante 10 minutos a 60° ± 1°C em banho-maria ou num bloco de aquecimento.
3. Retirar os tubos de Reagente Sonda do banho-maria ou do bloco de aquecimento e deixá-los à temperatura ambiente pelo menos 5 minutos. Retirar e eliminar as tampas. Ler os resultados com o Luminómetro GEN-PROBE na meia hora seguinte.

E. DETECÇÃO

1. Seleccionar o protocolo apropriado no Luminómetro GEN-PROBE.
2. Para retirar qualquer resíduo da superfície dos tubos, limpá-los com papel absorvente húmido. Colocar os tubos no Luminómetro GEN-PROBE e seguir as instruções do manual de utilização.
3. Quando terminar a análise, retirar os tubos do luminómetro.

NOTAS

A. REAGENTE: O Reagente 2 (Reagente de Hibridização) e o Controlo Positivo podem precipitar. Aquecer e misturar a 60° ± 1°C durante 2 minutos para dissolver este precipitado.

B. TEMPERATURA: As etapas de Hibridização e de Selecção são termo-dependentes. Consequentemente, é imperativo manter o banho maria ou o bloco de aquecimento à temperatura preconizada, durante todo o teste.

C. DURAÇÃO: As etapas de Hibridização e de Selecção são dependentes do tempo. A Hibridização deve durar pelo menos 45 minutos mas não mais de 60 minutos. Durante a etapa de SELECÇÃO, incubar os tubos Reagente Sonda durante pelo menos 10 minutos mas nunca mais de 12 minutos.

D. BANHO-MARIA: O nível de água deve ser mantido de maneira a que a totalidade do líquido reaccional contido nos tubos de Reagentes Sonda esteja bem imerso.

E. UTILIZAÇÃO DO VORTEX: É importante ter uma mistura homogénea durante a etapa de SELECÇÃO, mais especificamente desde a adição do Reagente 3. Todas as misturas devem estar no fundo do tubo durante as incubações.

F. AMOSTRAS DE MEIOS CONTENDO CÉLULAS: Se um grande número de células eucariotas está presente na amostra (ou seja suspensões de células), centrifugar a 500 x g durante 5 minutos. Retirar o sobrenadante formado e pipetar 1,5 ml como amostra. Voltar à etapa 1 da PREPARAÇÃO DA AMOSTRA.

G. PREPARAÇÃO DO SEDIMENTO: Durante a preparação das amostras, retirar o máximo de sobrenadante das amostras centrifugadas com uma pipeta Pasteur. Ficou provado que restos de meio levam a falsos positivos baixos. No entanto, ter cuidado em não tocar no sedimento de micoplasmas uma vez que este pode não ser visível.

H. AMOSTRAS COM RESULTADO DUVIDOSO:

1. O crescimento das culturas na presença de antibióticos pode reduzir a concentração dos micoplasmas. É aconselhado transferir as células para dois meios consecutivos sem antibióticos antes de testá-las. Os meios testados devem ter estado em contacto com as células durante pelo menos três dias.
2. A preparação de uma quantidade maior de amostra favorece proporcionalmente a sensibilidade do teste. Para preparar um sedimento a partir de uma amostra maior, fazer da seguinte maneira:
   a. Pegar num tubo de centrifuga que possa conter de 10 a 50 ml e que suporte uma centrifugação a grande velocidade. Marcar cuidadosamente a posição do sedimento quando este se formar.
   b. Acrescentar os meios colhidos e centrifugar de 12.000 a 15.000 x g durante 15 minutos. Decantar cuidadosamente o sobrenadante e eliminá-lo. O sedimento pode não ser visível por isso devem ser tomadas precauções durante esta etapa para o preservar.
   c. Resuspender o sedimento em suspensão em 1,5 ml de soro fisiológico estéril ou de meio de cultura celular e proceder à etapa 1 da PREPARAÇÃO DA AMOSTRA.

RESULTADOS

A. INTERPRETAÇÃO DOS RESULTADOS

Os resultados do SISTEMA GEN-PROBE MTC-NI DE DETECÇÃO RÁPIDA são interpretados em função de valores limiares RLU (Relative Light Unit). As amostras produzindo um sinal luminoso de valor superior ou igual a este limite são consideradas como positivas. Os sinais luminosos inferiores a este limiar são considerados como negativos. Quando o resultado está situado numa zona duvidosa, o teste deve ser repetido. Se a segunda análise der novamente resultados duvidosos, induzindo a uma fraca contaminação, é necessário testá-la novamente como descreve o parágrafo NOTAS.

	Positivo	Negativo
Valor limiar:	> 5.000 RLU	< 3.000 RLU
Valor duvidoso:	3.000 a 5.000 RLU	

B. CONTROLO DE QUALIDADE E VALIDAÇÃO DOS RESULTADOS

Os controlos negativos e positivos devem estar dentro dos seguintes valores:

Controlo negativo: < 3.000 RLU
Controlo positivo: 35.000-85.000 RLU

Para verificar a calibração da máquina e o seu funcionamento, consultar o manual do Aparelho.

LIMITES DO TESTE

Utilizar unicamente para a detecção de contaminação bacteriana em amostras de culturas celulares. Outras bactérias, além dos micoplasmas, podem induzir uma reacção positiva se forem lisadas durante a preparação da amostra.

Este teste não permite diferenciar as espécies bacterianas.

Um resultado negativo não pode excluir a possibilidade de contaminação por micoplasmas, com uma concentração abaixo da sensibilidade do teste, que é aproximadamente de 100.000 micoplasmas por ml de meio de cultura.

Este teste vai detectar algumas outras espécies bacterianas se estas forem lisadas durante a preparação da amostra, consultar o parágrafo COMPORTAMENTO FUNCIONAL DO TESTE. Em todos os casos, um resultado positivo indica uma contaminação da amostra de cultura celular.

COMPORTAMENTO FUNCIONAL DO TESTE

A hibridização da sonda com um leque variado de espécies de *Acholeplasma, Mycoplasma, Spiroplasma*, e *Ureaplasma* deram sinais positivos a > 10^5 organismos.

As seguintes espécies de micoplasmas estão entre as que são testadas com o SISTEMA GEN-PROBE MTC-NI DE DETECÇÃO RÁPIDA

Acholeplasma laidlawii	*Mycoplasma negroni*
Mycoplasma arginini	*Mycoplasma neurolyticum*
Mycoplasma arthritidis	*Mycoplasma orale*
Mycoplasma collis	*Mycoplasma pirum*
Mycoplasma fermentans	*Mycoplasma primatum*
Mycoplasma gallisepticum	*Mycoplasma pneumoniae*
Mycoplasma genitalium	*Mycoplasma pulmonis*
Mycoplasma hominis	*Mycoplasma sualvi*
Mycoplasma hyorhinis	*Spiroplasma species*
Mycoplasma iowae	*Ureaplasma parvum*
Mycoplasma muris	*Ureaplasma urealyticum*

Os organismos Gram negativos provenientes de uma grande variedade de “taxons” produzem também sinais positivos com a sonda bacteriana de largo espectro utilizada neste dispositivo aquando da preparação, como está descrito no parágrafo Preparação da Amostra. A reacção com microrganismos Gram positivos depende da capacidade de lise das bactérias durante a preparação da amostra. Utilizando condições de lise apropriadas, qualquer organismo Gram positivo de uma grande variedade de “taxons”, pode reagir com este sistema de sondas. Não foi observada nenhuma reacção com eucariotas alvos.

VALORES ESPERADOS

A. AMOSTRAS:

Foram testadas cento e cinquenta amostras com o dispositivo GEN-PROBE MTC-NI e com o teste isotópico GEN-PROBE MTC.

Os valores limiares para as amostras positivas variam de 7.644 a 3.034.700 RLU.

Os valores limiares para as amostras negativas variam de 490 a 2.963 RLU.

Não houve amostras discordantes, todas as amostras positivas pelo teste isotópico também o são pelo teste não-isotópico. Todas as amostras negativas deram resultados negativos pelos dois métodos.

B. CONTROLOS:

Foram testados cento e cinquenta controlos, dando os seguintes resultados:

	Número de observações	Valores limiares RLU
Controlos negativos	81	273 a 2.484 média = 903 ± 371 SD
Controlos positivos	69	35.489 a 72.955 média = 52.092 ± 8.283 SD

Estes dados foram obtidos por vários técnicos em dias diferentes com lotes de reagentes diferentes utilizando LEADERS GEN-PROBE diferentes.

RESOLUÇÃO DE PROBLEMAS

CONTROLO POSITIVO BAIXO (< 35.000 RLU)

A. Confirmar se o tubo de controlo positivo contém aproximadamente 800 µl. Valores de leitura baixos podem indicar que foram acrescentados menos de 100 µl de Controlo positivo no tubo Sonda Controlo Positivo.

B. Verificar se a temperatura do banho-maria ou do bloco de aquecimento é de 60° ± 1°C.

C. Assegurar-se que o tubo de Reagente Sonda esteja imerso em banho-maria ou no bloco de aquecimento de modo a que o líquido reaccional esteja completamente coberto. Durante o teste, evitar qualquer entrada de água ou de solução não estéril nos tubos sonda.

D. Regular o luminómetro para um tempo de leitura de 2 segundos.

E. Verificar o material de pipetagem.

CONTROLO POSITIVO ALTO (> 85.000 RLU)

A. Confirmar se o tubo de controlo positivo contém aproximadamente 800 µl. Os valores de leitura altos podem indicar que os 300 µl de reagente de selecção não foram adicionados.

B. Verificar se a temperatura do banho-maria ou do bloco de aquecimento é de 60° ± 1°C e se o luminómetro funciona correctamente.

C. Confirmar se os tubos são incubados 10 minutos durante a etapa de Selecção.

CONTROLO NEGATIVO ALTO (> 3000 RLU)

A. Controlar se o tubo de controlo negativo contém aproximadamente 800 µl. Valores de leitura altos podem indicar que os 300 µl de reagente de selecção não foram adicionados.

B. Verificar se a temperatura do banho-maria ou do bloco de aquecimento é de 60° ± 1°C e se o luminómetro funciona correctamente.

C. Confirmar se os tubos são incubados 10 minutos durante a etapa de SELECÇÃO.

D. NÃO trocar as tampas dos controlos negativos e positivos.

E. Eliminar a electricidade estática limpando os tubos com papel absorvente ou tecido húmido, antes de os colocar no luminómetro.

AMOSTRAS NA ZONA DUVIDOSA (3000-5000 RLU)

A. Verificar se a temperatura das incubações é de 60° ± 1°C. Deve ser utilizado um termómetro.

B. Verificar se a amostra é homogénea e se não há nenhuma gota acima da superfície do líquido durante as incubações.

C. As culturas podem estar contamidadas com uma concentração muito baixa de bactérias. Aumentar a sensibilidade do teste como está descrito no parágrafo NOTAS - H. As células podem precisar de duas subculturas após as ter retirado da congelação, de modo a ter um número suficiente de bactérias para a detecção.

D. Os meios de cultura não podem ser congelados antes da centrifugação, etapa 2 do parágrafo PREPARAÇÃO DA AMOSTRA.

LEITURAS VARIÁVEIS

A. Verificar o funcionamento do material de pipetagem.

B. Eliminar a electricidade estática, limpando os tubos com papel absorvente ou tecido húmido antes de os colocar no luminómetro.

C. Assegurar-se que a totalidade do sedimento da amostra está novamente em suspensão de forma homogénea e que foi transferido para o tubo sonda.

D. Verificar o funcionamento das bombas do luminómetro como indicado no Manual do Aparelho. Verificar a calibração do aparelho.

E. A contaminação dos tubos ou dos reagentes com RNase ou bactérias pode afectar os resultados do teste. Utilizar uma técnica asséptica durante a manipulação dos tubos e dos reagentes.

BIBLIOGRAPHY BIBLIOGRAPHIE LITTERATURE BIBLIOGRAFIA

1. **Barile, M. F.** 1977. Mycoplasma contamination of cell cultures: a status report. p. 291-334. Cell culture and its applications. Academic Press, New York, New York.
2. **Barile, M. F., H. E. Hoops, and M. W. Grabowski.** 1978. Incidence and sources of Mycoplasma contamination: a brief review. p.35-45. *In* G. J. McGarrity, D. G. Murphy and W. W. Nicholes (ed.), Mycoplasma infection of cell culture. Plenum Press, New York, New York.
3. **Lincoln C. K., and M. G. Gabridge.** 1998. Methods Cell Biol, **57:**49-65.
4. **Maniloff C. J., R. N. McElhaney, L. R. Finch, and J. B. Baseman,** 1992. ed. Mycoplasmas: molecular biology and pathogenesis.. American Society for Microbiology, Washington, D.C.
5. **McGarrity, G. J.** 1982. Detection of Mycoplasmal infection of cell cultures. p. 99-131. Advances in cell culture, Vol. 2. Academic Press, New York, New York.
6. **McGarrity, G. J., and H. Kotani.** 1985. Cell culture Mycoplasmas. *In* S. Razin, and M. F. Barile (ed.). The Mycoplasmas Vol. IV, Mycoplasma pathogenicity. Academic Press, New York, New York.
7. **Nelson N. C., M. A. Reynolds, and L. J. Arnold, Jr.** 1995. Detection of acridinium esters by chemiluminescence p. 391-428. *In* Kricka, L. J. (ed.), Non isotopic probing, plotting and sequencing. Academic Press, Inc. San Diego, CA.
8. **Rottem, S. and M. F. Barile.** 1993.Beware of mycoplasmas. TIBTECH, **11:**143-151.
9. **Stacey A., and A. Doyle.** 1997. Routine testing of cell cultures and their products for mycoplasma contamiation. Methods in Molecular Biol, **75:**305-11.
10. **Weisburg, W. G., J. G. Tully, D. L. Rose, P. Petzel, H. Oyaizu, D. Yang, L. Mandelco, J. Sechrest, T. G. Lawrence, J. Van Etten, J. Maniloff, and C. R. Woese.** 1989. A phylogenetic analysis of the mycoplasmas: basis for their classification. J Bacteriol., **171:**6455-6467.

Gen-Probe and associated logos are trademarks and/or registered trademarks of Hologic, Inc. and/or its subsidiaries in the United States and/or other countries.

Gen-Probe und die zugehörigen Logos sind Marken und/oder eingetragene Marken von Hologic, Inc. und/oder seinen Tochterunternehmen in den Vereinigten Staaten und/oder anderen Ländern.

Gen-Probe et les logos associés sont des marques commerciales et/ou des marques déposées d'Hologic, Inc. et/ou de ses filiales aux États-Unis et/ou dans d'autres pays.

Gen-Probe y los logotipos asociados son marcas comerciales y/o marcas comerciales registradas de Hologic, Inc. y/o de sus subsidiarias en los Estados Unidos y/o en otros países.

Gen-Probe e i relativi loghi sono marchi commerciali e/o marchi commerciali registrati di Hologic, Inc. e/o delle aziende consociate negli Stati Uniti e/o in altri paesi.

Manufactured by
Hergestellt von
Fabriqué par
Fabricado por
Prodotto da
Fabricado por

Gen-Probe Incorporated
San Diego, CA 92121 (USA)

Distributed by
Vertrieb durch
Distribué par
Distribuido por
Distribuito da
Distribuído por

bioMérieux s.a.
69280 Marcy l'Etoile
FRANCE

104574F Rev. D 2013-03
©1999-2013 Gen-Probe Incorporated